

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Fisiología Animal II



TESIS DOCTORAL

Acciones osteogénicas de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en modelos experimentales de diabetes mellitus tipo 1 y con déficit del factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana López Herradón

Directores

Pedro Esbrit Argüelles
Sergio Portal Núñez

Madrid, 2014



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA ANIMAL II**

**ACCIONES OSTEOGÉNICAS DE LA
PROTEÍNA RELACIONADA CON LA
PARATHORMONA (PTHrP) EN MODELOS
EXPERIMENTALES DE DIABETES
MELLITUS TIPO 1 Y CON DÉFICIT DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA
INSULINA-I (IGF-I)**

Memoria para optar al grado de Doctora presentada por:

ANA LÓPEZ HERRADÓN

**Directores:
PEDRO ESBRI ARGÜELLES
SERGIO PORTAL NÚÑEZ**

Madrid, 2014

El **Dr. Pedro Esbrit Argüelles**, Jefe Asociado del Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo del Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz, y el **Dr. Sergio Portal Núñez**, Investigador Post-Doctoral del mismo laboratorio

INFORMAN:

Que **Dña. Ana López Herradón**, Licenciada en C.C. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la Tesis Doctoral: "**Acciones osteogénicas de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en modelos experimentales de Diabetes mellitus tipo 1 y con déficit del factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I)**".

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conformes con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente en Madrid, a 15 de Enero de Dos Mil Catorce.



Dr. Pedro Esbrit Argüelles



Dr. Sergio Portal Núñez

Los estudios de esta Tesis Doctoral han sido posibles gracias a la financiación de las siguientes Instituciones Académicas: Fundación Conchita Rábago, Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Subprograma FPU), Comunidad de Madrid (S2009-MAT-1472), Fundación Médica Mutua Madrileña (5037/001), Red Temática de Investigación Cooperativa "Envejecimiento y Fragilidad" (RD06/0013/1002) y el Instituto de Salud Carlos III (PI080922 y PI011/0049).

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

La obtención de algunos resultados de esta Tesis Doctoral fue posible gracias al establecimiento de colaboraciones con otros grupos externos al IIS-FJD. En particular, quiero agradecer: el tiempo y la inestimable ayuda de los Dres. Carlos Guillén y Alberto Bartolomé (Facultad de Farmacia, UCM, Madrid) en los estudios de autofagia; al Dr. Víctor Ruíz (Instituto de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid) por suministrarnos las células mOBs, a los Drs Adolfo García Ocaña y Andy Stewart (Universidad de Pittsburg, PA, EE.UU.) por donarnos generosamente la PTHrP (1-36) y el plásmido con sobreexpresión de la PTHrP humana, al Dr. Juan Gambini (Universidad de Valencia) por la detección de las proteínas carboniladas; a las Dras. Isabel Varela y Lourdes Rodríguez (IIB, CSIC, Madrid) por facilitarnos y caracterizar los ratones deficientes en IGF-I; y a la Dra. María Almeida (Universidad de Arkansas, EE.UU.) por cedernos de forma generosa el plásmido codificante para el factor de transcripción FoxO.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Y entonces por fin llega el día... y sin apenas darme cuenta ya han pasado casi 5 años desde que decidí aceptar este gran reto. No fue fácil. Sin embargo, a pesar de la incertidumbre y del miedo a no estar a la altura, lo cierto es que aquí estoy, con la satisfacción de haber dado lo mejor de mí y que ello merezca tanto la pena. Resulta difícil describir con palabras el cúmulo de emociones que siento llegado este momento. Y es que detrás de cada página se esconden horas de esfuerzo, dedicación y cariño a este libro; momentos de grandes alegrías y éxitos y también de algunas frustraciones. Ésta es mi Tesis. Una Tesis que no habría sido posible sin la ayuda de quienes incluyo en estas líneas, personas que hacen de este libro un capítulo inolvidable en mi vida.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis **Directores de Tesis**, los Dres Esbrit y Portal. A tí Pedro, por ser la primera persona que confió en mí para sacar adelante este proyecto, por abrirme las puertas de tu laboratorio y hacerme ver lo importante que es hacer investigación sanitaria de calidad, por tu gran ayuda y aconsejarme siempre de forma tan cercana. A tí Sergio, porque siento que esta Tesis es tan mía como tuya. Gracias de corazón por haberme guiado desde el primer hasta el último día y por hacerme creer que yo era capaz de llegar hasta aquí. Admiro tu pasión y seriedad científica, además de tu paciencia infinita. Os debo muchísimo a ambos, gracias por todo.

A la Fundación Conchita Rábago, al Ministerio de Educación, a la Comunidad de Madrid, a la *European Calcified Tissue Society*, a la Red de Envejecimiento y Fragilidad y a la Universidad Internacional Menéndez Pelayo por financiar mi formación como investigadora en el laboratorio y en diferentes cursos y congresos.

A mis colaboradores, los Dres Carlos Guillén y Alberto Bartolomé, por descubrirme el maravilloso y apasionante mundo de la autofagia. Carlos, gracias por recibirme en tu laboratorio siempre con tantísimo cariño y por animarme tanto con ese entusiasmo en cada palabra, gracias. Alberto, eres un genio, gracias por compartir tanta sabiduría y por tu paciencia contestando todas mis dudas autofágicas. Gracias a Anita por su ayuda. Ha sido una auténtica maravilla trabajar con todos vosotros chic@s.

Al personal del hospital, personas que han hecho mi vida muy fácil allí. A Eva, María y Nieves por tratarme tan bien y solucionar los papeleos. A Antonio González por su implicación en la tramitación de mi beca FPU. Al personal del animalario, a Carlos y al Dr. Castilla por enseñarme a dibujar una tibia como es debido. A Curra por ser una mujer de bandera, gracias por tantas horas de confocal en la mejor compañía. A Valentín, por esos artículos que parecían imposibles de conseguir. A Ignacio Mahillo por su ayuda estadística. Al Servicio de Medicina del Trabajo, a Ana e Inma por cuidar de mí con tanto mimo. A Juan Moreno por ayudarme en la maquetación de esta Tesis y a los técnicos de informática por revivir mi ordenador. Al personal de la Cafetería por su amabilidad, a mi Santi, por todo tu cariño; a Isabel por tener a punto siempre el material, a Flor y a Pilar por tratarme como una hija y animarme tanto; a Osquitar por nuestras conversaciones; a los chicos del Almacén por su simpatía y ser tan atentos conmigo; a Diego de Mantenimiento por tratarme con tanta dulzura y al personal de limpieza por hacerme compañía todas esas tardes-noches cuando ya todo el mundo se había ido, gracias Paqui, Mayte y mi Carmen por todo el cariño que me habéis dado.

A mis compañeros, porque el Laboratorio ha sido mi segunda casa y vosotros mi segunda familia. A Dani por ayudarme y enseñarme a ser fuerte, por haber cuidado siempre de mí, en London y todos los viajes, y sobretodo por haber estado junto a mí el día más difícil de mi vida, gracias; a Marta por ser una gran compañera de batalla además de aguantar mis historias para no dormir, por los innumerables momentos de risas, por escucharme y apoyarme siempre, gracias guapa; a Adela por tu risa contagiosa, tus consejos y el gran apoyo; y a Juanan por ser no solo un buen compañero sino tan buena persona (aunque aún te rías de Almería-Valencia-Dinamarca...jajaja), por escucharme y animarme tantísimas veces y porque eres un investigador absolutamente brillante, te admiro muchísimo. Chic@s, gracias por aguantar mis mil y una notitas y sobretodo por todo lo vivido, os quiero mucho.

A quienes visitaron el laboratorio. A Angy por aquel verano de complicidad entre *Western Blots* y a Pablo Mortarino, por ser un chico maravilloso, gracias por las horas de charla con tantísimo cariño, por animarme a tener fe y por hacer que me sienta especial, eres grande Pablo. A Irantzu, ¡por compartir los últimos nervios!

Dar las gracias también a los antiguos integrantes del Laboratorio. A Verónica Alonso por ser un absoluto amor, por todo tu cariño y transmitirme tanta tranquilidad. A Álvaro Valín y a Arancha Rodríguez de Gortázar por sus ánimos tan sinceros.

A Arantxa Ortega, qué te voy a decir a tí, gracias por confiar en mí y darme esta oportunidad, por tu entusiasmo y tu perseverancia, ¡vamos a darlo todo!

No quiero dejar de mencionar a quienes fueron mis compañeros en mis días en el Hospital 12 de Octubre, porque nunca podría olvidar dónde y con quién di mis primeros pasos como investigadora. A Elisa, Cris, María Cevey, Javi, Jorge, María Guzmán, Marcela, Diana, Paloma, Verónica, Isabel y Juncal. En especial, a Iván Bernardo por ser el mejor R mayor que pude tener. Gracias por haber cuidado de mí, por enseñarme a trabajar desde 0 y por tus lecciones de madurez. "Unos te verán llegar, a algunos los verás marchar y otros te verán marchar a tí". A los Dres Paz, Serrano, Castro y Varela mi más sincero agradecimiento por aquel año que pasé entre vosotros y que me trae tan buenos recuerdos.

A los compañeros del IIS-FJD. A las Inmunitas, Gloria, Marina, Maru, Bárbara, Zubi, Marta, María, Aroa, Lau y Esther por ser fantásticas. Incluyo también aquí a Charly, Fer, Irene y a Vero y sus bizcochos (sin palabras). A David y Miriam de Inmuno por ser tan majos; a Cristi, M^aPaz, Vero y Eri de Alergia por ser un encanto todas y cada una de ellas; a los Egidos por prestarme siempre lo que necesitaba, en especial a Jonay por su gran apoyo y tantas conversaciones, a Cris por su energía y vitalidad contagiosas y a Conchi, Cristian, Raúl, Sandra e Irene por ser tan buena gente. A Kike por esas caminatas del metro al hospital tratando de resolver el mundo, eres genial. A los compañeros del laboratorio de Reuma, especialmente a Jessi, Iván, Antonio, Rudi, Amanda, Ane, Juan, Sandra, y Natalia. A Marta y a Concha de la Piedra de Bioquímica por su carisma y compañía en los congresos de la SEIOMM. A las chicas del laboratorio de Lípidos, Ali, Stef y Lorena, ¡gracias por todo lo compartido guapas! A Noelia de Micro, por ser de esas compañeras difíciles de olvidar. A Gemita también de Micro por ser tan buena persona. A las compañeras del laboratorio de Hormonas, a Alicia e Irene Ramos y a mi Irene Gutiérrez por ser lo mejor que me llevo del hospital, ¡te quiero tanto! Gracias por tu ayuda incalculable y por ser una verdadera amiga, ¡cuenta conmigo siempre! Al labo de Neumo por acogernos y dejarnos el microscopio. A Sarita, Miguel y Mónica de Genética por brindarme siempre una sonrisa. A la gente de Anatomía Patológica, en especial a Raúl por haber sido tan importante para mí, por todo su cariño y "chalaúras" durante estos años, a Cristina por ser una inyección de positivismo, a Rebeca porque eres un amor de niña y a Rubén, porque ha resultado muy fácil ser tu fan, gracias por detalles inolvidables. Y a la gente del Oncolab, Auri, María, Javi, Laura, ¡sois absolutamente geniales gente de la Foncicueva!

A las personas que he conocido recorriendo el mundo. To my friends of the ECTS PhD Training Courses and ECTS Congresses, Inês, Carole, Prabha, Asim, Jordi, Eddie, Karmele, Simona, Jovana, María, I keep great memories of every meeting I shared with all of you, thank you so much! You did Glasgow, Ljubljana, Stockholm and Oxford absolutely unforgettable. To Pete for that worth moments. A las personas con las que compartí curso de verano en Santander, a Alicia, las Gemelis, Inma, Eemeli, Salim y a tí, David Pastorino, por hacerme sonreír siempre, por llevarme a todas las fiestas sin necesidad de estar presente y por ser un niño tan especial. Te debo una visita a Barcelona, prometido. A Jaime, por todo lo vivido en Zaragoza (¡mítico!) y en Madrid, ¡eres absolutamente inolvidable y el cariño que te tengo es inmenso! A David Guede, por tantas risas compartidas en la ECTS y la SEIOMM. A Pablo Román, por elogiar mi póster en aquella SEIOMM antes de saber que éramos primos, qué fuerte, ¿eh? Jajaja.

A personas que son especiales. A Marina porque eres una amiga en mayúsculas, gracias por perdonar mis ausencias (¡ahora estaré más libre!) y por ser única escuchando, te quiero muchísimo. A mis chicas guapas, Rosa y Laura Molero por aportarme tanto en tan poco tiempo, por haber sido imprescindibles en esta recta final, sois geniales, gracias por todo vuestro apoyo. A Patricia por todo lo que tengo que agradecerle, por escucharme y aconsejarme tan bien. Por haber compartido lo bueno y lo malo y por la cantidad de risas sin control que nos marcamos, baby! A María y su familia por acogerme aquel verano en Chiclana, ¡seguid brillando! A Sari porque eres una tía estupenda y vales muchísimo nena; a Mario por tantos años de amistad y cariño, te adoro; a Laura Fresno por todo lo bueno que has hecho por mí, por tu sensibilidad y cariño, ¡eres maravillosa Lau! A Laura Cardenal por estar siempre ahí desde peques y a las chicas de Calalberche por esos días piscineros. A Noemi, María y Gemita, por estar tan pendientes de mí y demostrarme tanto. A Karim, porque eres único e inigualable, gracias por una amistad tan bonita, ¡¡voy a echarte de menos!! Recuerda que vayas donde vayas ¡siempre quedará el *Trypan Blue* para unirnos! A Julio por ser una gran persona, gracias "Desconocido" :). A mis chicos de Zaragoza por tratarme tan bien por tierras mañas, Beto, Jose y Sr. Cebolla, ¡gracias! A Sarita y a Abraham, ¡porque aún nos debemos muchas patinadas! A Nandi, por todas las cosas buenas que me has aportado desde hace años, ¡espero poder hacerte esa visita a Londres! A Balta, porque decir que eres un amor se queda corto, gracias por todo. To my friends Louise and Lewis, for their patience hearing my terrible english and share a lot of nice moments, I miss you both.

A Young, mi coreano guapo, gracias por tu compañía esos meses, I miss you. To my "*strugglemates*", for all your support, help and beautiful words during these years, thank you so much. A tu, Ar, per la màgia que té de vegades la vida, per donar inspiració a aquestes primeres fulles de la Introducció i per descobrir-me a Momo :). Et mereixes el millor, gràcies per tantes coses bones. Polseres amunt!

A Javito, por animarme siempre y por tus sabios consejos.

A Isabel Segovia, por tratarme con tanto mimo y quererme tanto.

A mis **médicos**, la Dra Agustina González por ser tan humana y por su inmenso cariño, mi agradecimiento eterno. Al Dr. Baca por todo lo que ha hecho por mí, a Julia y Antonio por recibirme siempre tan bien en consulta. Al Dr. Brik por preocuparse de mi bienestar. Por su paciencia, profesionalidad, ayuda e implicación, ¡espero que salgamos adelante! A Paquita por haber luchado tanto junto a mí, te quiero muchísimo.

A **Manuel**, por enseñarme lo que era felicidad y haber sido mi vida. Forever and ever.

A mi familia. Porque os lo debo todo y sin vosotros no sería capaz de seguir adelante. Gracias por aguantar mis malos momentos y porque aun lejos de entender mi lucha siempre estáis a mi lado. A tí Papá, por quererme y cuidarme tantísimo, por solucionarme la vida y porque aprendo de tí mucho más de lo que crees. Porque siento profunda admiración por tí por la gran persona que eres, por tu valentía, entereza y buen hacer de todas las cosas. Te quiero Papi. A tí Mamá, por ser mi compañera de batalla y levantarme siempre a pesar de que caiga una y mil veces. Por tu generosidad, bondad y amor infinito. Por ser quien da luz y guía mis días, por ser mi mejor amiga. Eres increíble, Mamá. A mi hermano Javier, por ser la persona que arregló el ordenador en el que he escrito esta Tesis y porque es la mejor persona que conozco. Por animarme a no rendirme nunca y creer en mí. No existe mayor nobleza de corazón que la tuya, hermano. A los 3, sois el pilar y el motor de mi vida, gracias por aceptarme como soy y por dejarme ser Ana con todo lo que conlleva. Os quiero con mi alma entera.

A mi abuelita Fina. No hay Tesis suficiente para darte las gracias. Gracias porque para tí siempre fui la mejor y me quisiste como no está escrito. Por tu ejemplo de lucha, coraje y valor hasta el final. Por ser mi alegría y mi fuerza. Y porque a pesar de que te echo de menos todos y cada uno de los días te llevo siempre conmigo. Estés donde estés ojalá te sientas orgullosa de mí, te quiero Abuela. A mi abuelo Guillermo porque también te siento muy cerca. Sé que nunca caminaré sola.

A mi abuela Angelita, por cuidar a tu Anitina durante tantos veranos, por ser un ejemplo de abu todoterreno y por comprender todos mis *yuyus*. A mis tios, Antonio, María, Trini, Santos y Tere por ser tan buenos conmigo e interesarse siempre por mi trabajo. A mis primos por los buenos ratos. A mi familia de Alicante, a mi primo Jorge porque no te digo nada y te lo digo todo, gracias por tu apoyo incondicional a pesar de cualquier distancia, eres el mejor, ¡te quiero guapo! A mi familia del País Vasco, a mi primo Eike y a mi prima Adhara porque te quiero con locura. A mi familia de Asturias, a Ángel y Emilia por compartir inquietudes científicas en medio de un "prau". A mi madrina Súper, por ser una pedazo de mujer, ¡por fin podré ir a verte! A Gemma, por valorar mi trabajo y compartir la emoción de este momento, ¡al final he podido con ello!

Trabajar en un hospital y poder investigar ha sido un sueño y poder desarrollar esta Tesis un auténtico regalo. Gracias a todos por haber sido y ser piezas fundamentales en la realización de este proyecto. Comienza otra etapa. Ilusión, emoción, miedo, riesgo, lucha. Pero cuanto mayor sea la lucha, más glorioso será el triunfo.

Madrid, Noviembre de 2013

A Mariano, Julia y Javier
A todos quienes me creyeron capaz de lograrlo

*The greater the struggle,
the more glorious the triumph
(The Butterfly Circus)*

RESUMEN

El hueso es un tejido conjuntivo especializado cuya característica fundamental es la calcificación de sus componentes extracelulares, ejerciendo así funciones de soporte y protección a diversos órganos. Además, ejerce funciones metabólicas como órgano regulador de la homeostasis fosfocálcica y de la glucosa. Sus componentes comprenden una matriz ósea compuesta fundamentalmente por fibras colágenas además de glucoproteínas y cristales de hidroxapatita y una celularidad consistente en: células osteoprogenitoras (con capacidad diferenciadora a células osteoblásticas), osteoblastos (encargadas de la síntesis de colágeno y de la formación ósea), osteocitos (células osteoblásticas completamente diferenciadas y embebidas en la matriz mineralizada) y osteoclastos (células encargadas de la resorción ósea).

El remodelado óseo es un proceso que ocurre a lo largo de la vida para la reparación del desgaste óseo y, además, contribuye a la homeostasis fosfocálcica. Este proceso tiene lugar en las denominadas unidades de remodelado óseo donde interaccionan las distintas estirpes de células óseas siguiendo una secuencia cíclica de una duración aproximada de 6 meses en humanos. Cada ciclo incluye 4 fases: Activación, en la que los osteocitos responden a estímulos mecánicos (microfracturas o falta de carga mecánica) o endocrinos liberando moléculas pro-apoptóticas que inducen la retracción de las células de revestimiento de la superficie mineralizada y el reclutamiento y activación de precursores osteoclásticos. Éstos se diferencian a osteoclastos por la acción del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando del receptor activador del factor nuclear- κ B (RANKL), producidos por células de estirpe osteoblástica. El acceso de los osteoclastos a la superficie ósea inicia la Fase de resorción. En esta fase, que dura unas 4 semanas, los osteoclastos quedan adheridos a la superficie mineralizada a través de integrinas y la osteopontina, creando un compartimento sellado acidificado por el bombeo de H^+ dependiente de ATP, lo que favorece la secreción y actividad de enzimas como la fosfatasa ácida tartrato-resistente (FATR), la catepsina K (Cat K) y metaloproteasas que degradan la matriz ósea. Este proceso determina la formación de lagunas de resorción denominadas de *Howship*. Fase reversa: A continuación, los osteoclastos entran en apoptosis y la *laguna de Howship* es invadida por pre-osteoblastos sobre los que actúan diversos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, promoviendo su diferenciación a osteoblastos maduros. En esta fase de unas 2 semanas de duración, destaca la activación de factores de transcripción que sirven además como marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica, el factor de transcripción 2 relacionado con RUNT (*Runx2*) y Osterix (*Osx*). La expresión de *Runx2* es crucial para el desarrollo

óseo, ya que induce la expresión de los principales genes implicados en la formación de la matriz ósea, *Col1a1*, que codifica para el colágeno de tipo I, *osteopontina* y *osteocalcina* (*Oc*). *Osx* actúa posteriormente a *Runx2*, permitiendo la diferenciación de pre-osteoblastos a osteoblastos maduros. Fase de formación: Durante 10 días aproximadamente se completa la formación del borde osteoide que, posteriormente, se mineraliza en un proceso que dura 1-3 meses facilitado por enzimas tales como la FA. Una vez completada esta fase, el 10-20 % de los osteoblastos permanecen embebidos en la matriz mineralizada como osteocitos, o en la superficie como células de revestimiento inactivas, mientras que la mayoría mueren por apoptosis. Tanto la formación como la resorción son procesos que se encuentran normalmente acoplados por la actuación coordinada de factores endocrinos, locales y estímulos mecánicos. Entre los factores locales destacan las proteínas WNT y el IGF-I, claves en la proliferación y diferenciación osteoblásticas durante el remodelado óseo.

La vía de señalización Wnt/ β -catenina debe su nombre a los ligandos efectores que comprenden un conjunto de glicoproteínas denominadas WNT, que activan la proliferación y la diferenciación celular en varios tejidos del organismo incluido el hueso. Se conocen 19 genes que codifican el mismo número de proteínas WNT, tanto en roedores como en humanos. Estas proteínas se clasificaron inicialmente de acuerdo a su capacidad para duplicar (WNTs canónicas) o no (WNTs no canónicas) el eje dorsal en embriones de *Xenopus*. De este modo, entre las proteínas canónicas encontramos a: WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A y WNT10B; mientras que entre las no canónicas se encuentran: WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT11 y WNT16. Esta clasificación es utilizada para simplificar, ya que existen proteínas WNT no canónicas que actúan como canónicas y viceversa. Las proteínas WNT sintetizadas por células como los osteoblastos sufren modificaciones postraduccionales para señalizar de modo autocrino/paracrino; en combinación con otros factores y vías de señalización, ejercen un importante control del remodelado óseo.

Por otra parte, los IGFs son los factores de crecimiento más abundantes en la matriz ósea, de la que son liberados durante la resorción. El sistema IGF está formado por IGF-I e IGF-II, los receptores mayoritarios de ambos factores, IGF-IR e IGF-IIR, respectivamente, y las proteínas transportadoras o proteínas de unión a IGF que exhiben una elevada afinidad por ambos IGFs, actuando como activadores o inhibidores de su acción. Tanto el IGF-I como el IGF-II poseen actividad anabólica,

especialmente el IGF-I, cuya síntesis ósea se regula por la acción de la GH y de la PTH.

En el hueso adulto sano, existe un equilibrio entre la cantidad de hueso formado y la de resorbido. La alteración de este equilibrio da lugar a patologías óseas, como la osteoporosis (OP), asociada a la pérdida y/o al deterioro de la masa y la estructura ósea. Este deterioro es particularmente acusado a nivel del hueso trabecular en localizaciones tales como las vértebras y la cadera, paralelo a un incremento en la porosidad cortical, lo que determina la susceptibilidad a fracturas.

De acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud, la OP se define por unos valores de densidad mineral ósea (DMO) que se desvían al menos 2,5 desviaciones estándar por debajo de la masa ósea promedio de la población sana joven (*T-score*). Valores de DMO de 1 y 2,5 desviaciones estándar por debajo de ese promedio definen la osteopenia. La OP se inicia por un desacoplamiento entre la resorción y la formación ósea. Se pueden dar varias situaciones: 1) la formación ósea tiene lugar pero no es capaz de restituir por completo la laguna de resorción (alto remodelado); 2) la laguna de resorción permanece prácticamente intacta con el ciclo de remodelado detenido en la fase reversa, sin que tenga lugar nueva formación ósea (bajo remodelado); 3) existe una disminución tanto de la fase de formación ósea como de la resorptiva dando lugar a un hueso adinámico. Cuando no se identifica ninguna patología causal se habla de OP primaria, mientras que cuando se asocia a condiciones patológicas previamente establecidas se habla de OP secundaria. Uno de los tipos más frecuentes de OP secundaria es la asociada a la Diabetes mellitus (DM). Esta patología metabólica se caracteriza por hiperglucemia crónica debida al déficit de producción y/o acción de la insulina (y de IGF-I). La DM (sobre todo la tipo 1) se asocia comúnmente a osteopenia/osteoporosis y al aumento de riesgo de fracturas, por mecanismos solo parcialmente caracterizados. La hiperglucemia en la DM induce una menor proliferación y función osteoblástica, que promueve la pérdida de masa ósea. Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran cómo este efecto se debe, al menos en parte, a una disminución de expresión de marcadores osteoblásticos, como Runx2, OC, COL1 α , osteonectina y osteopontina. En esta situación, se incrementa la producción de M-CSF, TNF- α y RANKL, activadores de la osteoclastogénesis, así como la expresión de marcadores adipocíticos como PPAR γ , la proteína adipocítica-2, adiposina y resistina. Además, la disminución de la microvascularización ósea es una característica de la DM que agrava la pérdida de masa ósea. La calidad ósea también se ve comprometida como resultado de la producción de productos de glicosilación

avanzada (AGEs) que contribuyen a la generación de estrés oxidativo, incrementando la fragilidad del hueso y el riesgo de fracturas.

Además, en la DM, la necesidad de la síntesis de insulina en las células β -pancreáticas en respuesta a la hiperglucemia provoca estrés de retículo endoplásmico y una activación de la autofagia en estas células. Este hecho resulta importante ya que se ha demostrado que la deficiencia de autofagia en ratones insulino-resistentes agrava su fenotipo diabético.

El importante impacto socioeconómico de la osteoporosis hace necesaria la búsqueda de nuevas terapias que ayuden a paliar los efectos de esta patología. Las terapias existentes para la OP pueden ser antiresortivas (las más frecuentes) o anabólicas (activadoras de la formación ósea). Entre las terapias anabólicas, el único tratamiento disponible en la clínica consiste en la inyección intermitente (diaria) de secuencias peptídicas de la PTH. Esta acción anabólica de la PTH parece ejercerse en parte a través del IGF-I en el entorno óseo.

La proteína relacionada con la PTH (PTHrP) se identificó inicialmente como el principal factor patogénico de la hipercalcemia tumoral de origen humoral. Sin embargo, posteriormente se demostró su expresión en la mayoría de los tejidos normales, donde ejerce acciones de citoquina tisular tanto durante el desarrollo como en el adulto. La PTHrP difiere completamente de la PTH más allá de la región homóloga N-terminal, siendo su región C-terminal más larga que en la PTH, y contiene distintos epítomos singulares, asociados a efectos auto/paracrinós e intracrinós en distintos tipos celulares. Como consecuencia de su procesamiento post-trasduccional, la PTHrP puede generar distintos fragmentos bioactivos: 1) un fragmento N-terminal 1-36; 2) uno o varios fragmentos en la región media, cuyos aminoácidos 88-91 y 102-106 son dominios de localización nuclear/nucleolar (NLS); y 3) un fragmento C-terminal a partir del aminoácido 107, que contiene la secuencia 107-111 conocida como “osteostatina” (Ost), con propiedades antiresortivas. De modo similar a la PTH, la administración continua del fragmento N-terminal de la PTHrP aumenta la resorción ósea, mientras su administración intermitente aumenta fundamentalmente la formación ósea.

Considerando los aspectos reseñados anteriormente, en la presente Tesis hemos pretendido identificar algunos de los mecanismos implicados en la osteopenia asociada a la DM que pudieran constituir de interés como dianas moleculares para aumentar la formación ósea. Hipotetizamos que las acciones osteogénicas de la

PTHrP en esta situación se ejercen interaccionando con la vía canónica de Wnt/ β -catenina (1) y de manera parcialmente independiente al IGF-I (2).

Para resolver dichas hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) En cultivos de células osteoblásticas, estudiar los efectos de la alta glucosa sobre la viabilidad y la diferenciación celular, así como en la activación de la vía Wnt/ β -catenina.
- 2) Determinar las interacciones de la PTHrP con la vía Wnt/ β -catenina en relación con su acción osteogénica en situación diabética *in vitro* e *in vivo*.
- 3) Caracterizar la capacidad osteogénica de la PTHrP en situación de deficiencia en IGF-I.

Para llevar a cabo dichos objetivos, en primer lugar, desarrollamos un modelo *in vitro* en células osteoblásticas MC3T3-E1 en el que suprimimos mediante silenciamiento génico la proteína ATG7, clave en el desarrollo del flujo autofágico celular. En este modelo y mediante el uso de inhibidores farmacológicos de la autofagia, demostramos su papel protector de los efectos deletéreos de la alta glucosa (AG) sobre la viabilidad y la diferenciación osteoblástica.

Además, *in vitro* utilizando cultivos de células osteoblásticas murinas con diferente grado de diferenciación, caracterizamos el efecto desestabilizador de la β -catenina por la AG, a distintos niveles de la vía Wnt, tanto a nivel de ligando activador WNT3a como a niveles más distales de esta vía canónica. Nuestros resultados indican que la degradación de la β -catenina es un evento clave en la inactivación de dicha vía de señalización por la AG. El estrés oxidativo producido por la AG parece contribuir a la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina en las células osteoblásticas.

En un modelo *in vivo* de ratones osteopénicos con DM tipo 1 inducida por estreptozotocina ratificamos las alteraciones óseas observadas mediante los parámetros histomorfométricos en las vértebras así como la inactivación de la vía Wnt canónica y un incremento de proteínas oxidadas en el fémur. Los resultados obtenidos en conjunto, tanto *in vitro* como *in vivo*, demuestran que la PTHrP a través de sus dominios N- y C-terminal, es capaz de contrarrestar, al menos en parte, la inactivación de la vía Wnt/ β -catenina en situación diabética.

Por otro lado, nuestros hallazgos indican una situación de franca osteopenia (en el fémur y en la columna L1-L5) en el modelo de ratón con déficit de IGF-I. El análisis de microtomografía computerizada (μ CT) demostró una alteración general en los parámetros estructurales evaluados en los compartimentos cortical y trabecular del fémur de estos ratones *Igf1*-nulos. El patrón de expresión génica y el conteo de células óseas en este compartimento óseo presentaron alteraciones compatibles con un déficit de diferenciación osteoblástica (y un aumento de osteoclastos), sin cambios aparentes de estrés oxidativo, en relación con el déficit de IGF-I. Además, en los ratones *Igf1*-nulos observamos que el tratamiento con los péptidos de la PTHrP fue parcialmente eficaz (fundamentalmente en el hueso trabecular); siendo destacable su acción estimuladora de otros genes del sistema IGF como posible mecanismo compensatorio en estos ratones.

En conclusión, hemos descrito la autofagia como un importante mecanismo para preservar la supervivencia y la función osteoblástica en un entorno diabético representado por la AG. Esta situación también afecta negativamente a la vía osteogénica de Wnt/ β -catenina a diferentes niveles en los osteoblastos. Además, la deficiencia de IGF-I induce efectos selectivos en el tejido óseo, aparentemente no relacionados con el estrés oxidativo, pero asociados a la pérdida de masa y al deterioro de la estructura ósea. Nuestros hallazgos demuestran que la PTHrP, a través de sus dominios N- y C-terminal, es capaz de modular la vía de Wnt canónica en relación a sus acciones osteogénicas en situación diabética y, también en parte, en ausencia de IGF-I.

SUMMARY

Bone is a specialized tissue with calcification of its extracellular components, which exerts mechanical support and protection to various organs. In addition, bone is an important modulator of phosphorus, calcium and glucose homeostasis. Bone components consist of an extracellular matrix mainly made of collagen fibers and also several glycoproteins and hydroxyapatite crystals. Bone cellularity comprises: osteoprogenitors (with osteoblast differentiating capacity); bone forming osteoblasts; osteocytes (terminally differentiated osteoblasts embedded in the mineralized matrix); and bone resorbing osteoclasts.

Bone remodeling is a process that occurs throughout life span to repair damaged bone, and it also contributes to mineral homeostasis. It takes place in the so-called bone remodeling units where different bone cell types interact according to a sequential scheme spanning a period of about 6 months in humans. Each cycle includes 4 phases: Activation, in which osteocytes respond to either mechanical stimuli (microfractures or unloading) or endocrine inputs by releasing pro-apoptotic factors that induce lining cell retraction on the mineralized surfaces and the recruitment and activation of osteoclast precursors. The latter cells are prone to differentiate into osteoclasts by the action of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), which are produced by cells of the osteoblast lineage. Osteoclasts then adhere to the mineralized bone surface through the concourse of integrins and osteopontin thereby initiating the resorption phase whose length of time is about 4 h. During this phase, osteoclasts through the activity of H^+ -dependent ATPase create an acidic milieu in a sealed compartment, favouring secretion and activation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), cathepsin K (Cat K) and metalloproteases that degrade bone matrix. and determine the formation of resorption pits named *Howship* lacunae. Subsequently, in the so-called reverse phase, osteoclasts undergo apoptosis, which is followed by recruitment of pre-osteoblasts to the *Howship* lacunae where the concerted action of growth factors, hormones and cytokines promote their differentiation to mature osteoblasts. The time span of this phase is about 2 weeks, and involves the activation of transcription factors that are early markers of osteoblast differentiation, namely RUNT-related transcription factor 2 (*Runx2*) and Osterix (*Osx*). *Runx2* is a key factor for bone development because induces the expression of major genes implicated in bone matrix formation, *Col1a1*, encoding type I collagen, *osteopontin* and *osteocalcin* (*Oc*). *Osx* acts downstream to *Runx2*, promoting the formation of mature osteoblasts. The so-called formation phase ensues, whereby osteoid formation is completed in about 10 days,

followed by a slower period (1-3 months) of mineralization mediated by enzymes such as alkaline phosphatase (AP). At the end of this phase, 10-20 % of the osteoblasts remain embedded into the mineralized matrix as osteocytes, or as lining cells on the bone surface, whereas the majority of osteoblasts die by apoptosis. Bone formation and bone resorption are normally coupled by the concerted action of local and endocrine factors and of mechanical stimuli. Among these local factors, Wnt proteins and IGF-I are key modulators of osteoblastic growth and differentiation during bone remodeling.

Wnt/ β -catenin pathway comprises an array of glycoprotein effectors named WNT proteins, which activate cell proliferation and differentiation in various tissues including bone. Nineteen genes are known to encode the corresponding number of distinct WNT proteins in rodents and humans. These proteins were initially classified in accordance with their capacity for duplicating (canonical WNTs) or not (non canonical WNTs) the dorsal axis in *Xenopus* embryos. Therefore, canonical WNTs include: WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A y WNT10B; meanwhile, non canonical WNTs comprise: WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT11 y WNT16. This classification is used, however, for the sake of simplification, since WNT cross-activity is common between the two pathways. WNT proteins are synthesized by cell types such as osteoblasts, and they are posttranslationally modified to make them able to signal in an autocrine and paracrine manner. In this way, WNT proteins combined with other factors and signaling pathways exert an important control of bone remodeling.

IGFs are also abundant growth factors in the bone matrix, which release them during bone resorption. The IGF system is made of IGF-I and IGF-II, their receptors, IGF-IR e IGF-IIR, respectively, and several IGF binding proteins exhibiting high affinity for both types of IGFs, and can act as activators or inhibitors. Both IGF-I and IGF-II have bone anabolic activity. The synthesis of the most active factor of them in this regard, IGF-I, is modulated by systemic hormones, namely GH and PTH.

There is a fine balance between the amount of resorbed bone and that of newly formed bone in healthy adults. Alteration of this balance leads to bone pathologies such as osteoporosis (OP), which is associated with bone loss and deterioration of bone structure. This is particularly so in trabecular bone of vertebrae and the hip, parallel to augmented cortical porosity, which increases the fracture risk. According to the WHO criteria, OP is defined by bone mineral density (BMD) values 2.5 SD below the mean bone mass in the healthy young population (*T-score*). BMD values between 1

and 2.5 SD below this mean score is known as osteopenia. OP occurs by the uncoupling between bone formation and bone resorption. This can be associated with the following situations: 1) Bone formation is not sufficiently effective to re-established the integrity of the resorption pit (high remodeling); 2) The remodeling cycle proceeds at a slow pace with a predominance of the reverse phase (low remodeling); 3) Both bone formation and bone remodeling are diminished (adynamic bone). Primary and secondary OP refer to this condition unrelated or related to a specific disease, respectively. One of the most frequent causes of secondary OP is diabetes mellitus (DM), which is characterized by chronic hyperglycemia due to insulin (and IGF-I) insufficiency or resistance. DM (mainly type 1 DM) is commonly associated with osteopenia/osteoporosis and an increased fracture risk by poorly characterized mechanism. Diabetic hyperglycemia induces a low osteoblast proliferation and impairs osteoblastic function, leading to bone loss. Both *in vivo* and *in vitro* studies show that this is associated in part to a decreased expression of osteoblastic markers such as Runx2, OC, COL1 α , osteonectin and osteopontin. In this scenario, the production of M-CSF, TNF- α and RANKL, osteoclastogenic factors, is increased, and also that of adipocyte markers, namely PPAR γ , adipocyte protein-2, adiponectin and resistin. In addition, a decrease of bone microvascularization is a hallmark of DM that contributes to and aggravates bone loss and deterioration. The latter occurs also as a consequence of the production of advanced glycosylation products (AGEs) that contribute to generate oxidative stress, which increases bone fragility and the fracture risk.

Moreover, in a diabetic setting represented by hyperglycemia, the response of β -pancreatic cells involves stress of the endoplasmic reticulum and activation of autophagy. This is important since a deficit of the latter process aggravates the diabetic phenotype in insulin-resistant mice.

The important social and economic impacts of OP determines the necessity of effective therapies that increase bone accrual. Current OP therapies rely on anti-resorptives (the most common agents in this respect) or anabolic drugs targeting bone formation. Among the latter, PTH as daily injection is the only approved treatment for OP so far. Bone anabolism by this type of PTH administration appears to be mediated in part by IGF-I in the bone environment.

PTH-related protein (PTHrP) was initially identified as the main factor responsible for humoral hypercalcemia of malignancy. However, PTHrP is now known to be widely expressed in normal tissues, acting as a cytokine during development and

also in adults. PTHrP, which differs from PTH beyond the homologous N-terminal region, has an extended C-terminal tail containing unique epitopes displaying various autocrine, paracrine and intracrine actions in several cell types. By post-translational processing, PTHrP generates various bioactive fragments: 1) an N-terminal 1-36 fragment; 2) one or several mid-region fragments containing 88-91 and 102-106 aminoacids that are nuclear/nucleolar localization signals (NLS); and 3) a C-terminal fragment starting at aminoacid 107, comprising the sequence 107-111 named “osteostatin” (Ost), having antiresorptive features. As PTH, continuous administration of N-terminal PTHrP peptides increases bone resorption, whereas its intermittent injection mainly promotes bone formation.

Considering these facts described above, in the present Thesis we aimed to characterize some underlying mechanisms in DM-related osteopenia that might be molecular targets to increase bone accrual. We hypothesized that the osteogenic actions of PTHrP in this scenario would be, at least in part, a consequence of its interaction with the canonical Wnt/ β -catenin pathway (1) and also partially independent of IGF-1 (2).

In order to confirm the aforementioned hypothesis, we established the following aims:

- 1) Using osteoblastic cell cultures, we will evaluate the effects of high glucosa on cell viability and cell differentiation, and also the activation of the Wnt/ β -catenin pathway.
- 2) The posible interaction between PTHrP and the Wnt/ β -catenin pathway, associated with its osteogenic action, will be studied in a diabetic in vitro and in vivo situation.
- 3) Characterization of the osteogenic capacity of PTHrP in the setting of IGF-I deficiency.

Initially, we developed an *in vitro* model in osteoblastic MC3T3-E1 cells with suppressed ATG7 protein, which is a key molecule for the cellular autophagy process. Using this model and pharmacological inhibitors of autophagy, we demonstrate the protecting role of this event against the deleterious effects induced by high glucose (HG) on osteoblast viability and differentiation. In addition, using cultures of osteoblastic cells with different differentiation status, we evaluated the effect of HG on β -catenin destabilization, at different stages of the Wnt pathway, upstream at Wnt3a

ligand level and at more downstream levels in this canonical pathway. Our results indicate that β -catenin degradation is a key event in Wnt signaling inactivation by HG in osteoblasts. Oxidative stress triggered by AG appears to contribute to Wnt/ β -catenin inhibition in these cells. These *in vitro* findings were confirmed *in vivo* in a mouse model of type 1 DM after injection of streptozotocin, showing the bone alterations observed by histomorphometry in the mouse vertebrae and decreased Wnt signaling, related to increased oxidized proteins in the femur. Taken together, our *in vitro* and *in vivo* results also demonstrate that PTHrP, through its N- and C-terminal domains, can counteract in part Wnt/ β -catenin pathway inactivation in diabetic conditions.

Our findings also show a dramatic osteopenia in the long bones and vertebrae of mice with IGF-I deficiency. Computerized tomography (μ CT) disclosed a general alteration in all the trabecular and cortical parameters evaluated in the femur of these mice. Both gene expression pattern and bone cell counts in this skeletal compartment suggest a deficit of osteoblast differentiation (and an increased osteoclast abundance), apparently non related to changes in oxidative stress, associated with IGF-I deficiency. Furthermore, *Igf1*-null mice displayed only a partial response to PTHrP administration (mainly in trabecular bone). Of note, this treatment with each PTHrP peptide tested up-regulated other IGF system components as a putative compensatory mechanism for IGF-I deficit in these mice.

In conclusion, we have characterized autophagy as an important mechanism to preserve osteoblast survival and function in a diabetic setting represented by HG. This condition also negatively affects the osteogenic Wnt/ β -catenin pathway at different levels in osteoblastic cells. Moreover, IGF-I deficiency induces selective effects in bone tissue, apparently independent of oxidative stress, but associated with bone loss and bone structure deterioration. Our findings demonstrate that PTHrP, acting by its N- and C-terminal domains, is able to modulate canonical Wnt pathway related to its osteogenic actions in diabetic conditions and also partially in the absence of IGF-I.

ABREVIATURAS

μCT	Microtomografía computerizada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AG	Alta glucosa
AGEs	Productos finales de glicosilación avanzada
AKT	Proteína quinasa B
AMPc	Adenosín-3',5'-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por adenina monofosfato
APC	Proteína responsable de la poliposis adenomatosa de colon
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATG	Proteína relacionada con la autofagia
BME	Medio basal de Eagle
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BRU	Unidad de remodelado óseo
BS	Superficie ósea
BV/TV	Volumen trabecular óseo/Volumen óseo total
Cat k	Catepsina k
Ccnd1	Ciclina D1
CK	Caseína quinasa
CMO	Contenido mineral óseo
CMMOs	Células mesenquimales de la médula ósea
CRD	Dominio rico en residuos cisteína
Ct	Fragmento C-terminal de PTHrP (107-139)
Ct.Th	Espesor cortical
Conn.D	Conectividad D
Cx43	Conexina-43
DEXA	Absorciometría de rayos X de energía dual
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DKK	Proteína Dickkopf
DMO	Densidad mineral ósea
DVL	<i>Dishevelled</i>
EEM	Error estándar de la media
ERK	Quinasa regulada por factores extracelulares
FA	Fosfatasa alcalina
FATR	Fosfatasa ácida tartrato-resistente

FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FoxO	Proteínas tipo <i>Forkhead box</i>
FZ	Receptor <i>frizzled</i>
GCs	Glucocorticoides
GLP	Péptido similar al glucagón
GSK3 β	Glucógeno sintetasa quinasa-3 β
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina I
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina II
IGF-IR	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I
IGFBP	Proteína transportadora o de unión a IGF
IL	Interleuquina
IRS	Substrato del receptor de insulina
kVp	Pico kilovoltaje
LC3	Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3
LEF	Factor de unión al potenciador linfoide
LRP	Proteína relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad
NLS	Secuencias de localización nuclear
m-TOR	Proteína diana de la rapamicina en mamíferos
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos
MSCs	Células madre mesenquimales
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
mOBs	Osteoblastos de calota murina
NAC	N-acetilcisteína
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NG	Normoglucosa
NO	Óxido nítrico
Nt	Fragmento N-terminal de la PTHrP (1-36)
OC	Osteocalcina
OP	Osteoporosis
OPG	Osteoprotegerina
Ost	Osteostatina, PTHrP (107-111)
OSX	Osterix
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGs	Prostaglandinas
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A

PKC	Proteína quinasa C
PPAR	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas
PTH	Parathormona
PTHr1	Receptor de PTH/PTHrP tipo 1
PTHrP	Proteína relacionada con la parathormona
RANK	Receptor activador de NF-κB
RANKL	Ligando del receptor activador de NF-κB
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
Runx2	Factor de transcripción 2 relacionado con RUNT
SAB	Seroalbúmina bovina
SERMs	Moduladores selectivos de receptores de estrógenos
SFB	Suero fetal bovino
SFRP	Proteínas secretadas relacionadas con <i>Frizzled</i>
shARN	ARN de horquilla corta
SOST	Gen de la esclerostina
STZ	Estreptozotocina
T/A	Temperatura ambiente
T.Ar	Área de hueso cortical
Tb.N	Número de trabéculas
Tb. S	Separación trabecular
Tb.Th	Espesor trabecular
TCF	Factor de transcripción de célula T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TSF	Tampón salino fosfatado
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WIF	Factor inhibidor de WNT
WNT	Proteínas tipo <i>Wingless</i>

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. El hueso	2
1.1.1. Componentes del tejido óseo	2
1.1.2. Organización del tejido óseo	3
1.1.3. Formación ósea en el desarrollo	3
1.1.4. Modelado y remodelado óseo	4
1.1.4.1. Regulación del remodelado óseo y de la formación ósea	5
1.1.4.2. Mecanismos de acoplamiento entre la resorción y la formación ósea	10
1.2. La vía de señalización Wnt	11
1.2.1. Las proteínas Wnt	11
1.2.2. La vía Wnt canónica	12
1.2.2.1. Componentes de la vía Wnt canónica	13
1.2.2.2. Mecanismos moleculares implicados en la señalización Wnt canónica	14
1.2.2.3. La vía Wnt canónica y el remodelado óseo	16
1.2.3. Vías Wnt no canónicas	16
1.3. La osteoporosis (OP)	17
1.3.1. OP asociada a Diabetes mellitus (DM)	18
1.3.1.1. Papel de la autofagia en la DM	20
1.3.1.2. Papel de la insulina y del IGF-I en las alteraciones óseas en la DM	21
1.3.2. Tratamiento de la OP	22
1.3.3. La PTHrP como agente anabólico potencial en la OP	24
1.3.3.1. Papel de la PTHrP en la proliferación, diferenciación y supervivencia osteoblástica	26
1.3.3.2. La PTHrP y su relación con la DM.	27
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
3. MATERIAL Y MÉTODOS	30
3.1. Modelos experimentales <i>in vitro</i>	31
3.1.1. Células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1-subclon 4	31
3.1.1.1. Generación de células osteoblásticas MC3T3-E1 con inhibición de autofagia	31
3.1.1.2. Generación de clones estables de células MC3T3-E1 con sobreexpresión de PTHrP	33

3.1.2. Cultivo primario de osteoblastos de calota de ratón (mOBs)	34
3.1.3. Células C3H10T1/2	34
3.2. Modelos experimentales in vivo	35
3.2.1. Modelo de ratón con DM1	35
3.2.2. Modelo de ratón deficiente en IGF-I	36
3.2.3. Cultivo de CMMOs ex vivo	38
3.3. Técnicas experimentales	39
3.3.1. Ensayos de viabilidad celular y apoptosis	39
3.3.2. Medida de ROS	40
3.3.3. Transferencia <i>western</i> (Inmunotransferencia)	40
3.3.4. Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)	42
3.3.5. Ensayo de la actividad de fosfatasa alcalina (FA) y mineralización	43
3.3.6. Inmunocitoquímica de β -catenina	44
3.3.7. Ensayos de la actividad transcripcional de β -catenina y de FoxO	44
3.3.8. DEXA	45
3.3.9. Histomorfometría ósea	45
3.3.10. Análisis de μ CT	47
3.3.11. Histología ósea	48
3.4. Análisis estadístico	50
4. RESULTADOS	51
4.1. Caracterización del efecto de la AG en células osteoblásticas MC3T3-E1. Papel citoprotector de la autofagia	52
4.2. Efecto de la AG sobre la activación de la vía Wnt/ β -catenina en células osteoblásticas	58
4.3 Interacción de los péptidos de la PTHrP con la vía Wnt/ β -catenina en células osteoblásticas	63
4.4. Modelo de osteopenia asociada a DM1 en ratón. Acciones osteogénicas de la PTHrP	68
4.5. Alteraciones de la masa y la estructura óseas asociadas al déficit de IGF-I en ratón	72
4.6. Efecto diferencial de los péptidos PTHrP (1-36) y PTHrP (107-111) en la masa y la estructura ósea de ratones normales y deficientes en IGF-I	74
4.7. Efectos comparativos de la PTHrP sobre la expresión de genes óseos en ratones normales y con déficit de IGF-I	76

4.8. Cambios de expresión ósea de componentes del sistema IGF y su modulación por la PTHrP en ratones control e IGF-I-nulos	81
5. DISCUSIÓN	83
5.1. Papel citoprotector de la autofagia en células osteoblásticas expuestas a AG	84
5.2. Interacción de la AG con la vía Wnt/ β -catenina en células osteoblásticas. Papel modulador de la PTHrP	86
5.3. Acciones osteogénicas de la PTHrP asociadas a la interacción con componentes de la vía Wnt canónica en el modelo murino de DM1	89
5.4. Caracterización del papel del IGF-I en los efectos osteogénicos de los dominios N- y C-terminal de la PTHrP en ratón	91
6. CONCLUSIONES	95
7. BIBLIOGRAFÍA	97
8. ANEXOS	132
8.1. Publicaciones	133
8.2. Comunicaciones a Congresos	134
8.3. Premios y becas	135

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El hueso

El hueso es un tejido conjuntivo especializado cuya característica fundamental es la calcificación de sus componentes extracelulares, ejerciendo así funciones de soporte y protección a diversos órganos. Además, ejerce funciones metabólicas como órgano regulador de la homeostasis fosfocálcica y de la glucosa [1, 2].

1.1.1. Componentes del tejido óseo

La matriz ósea está formada fundamentalmente por fibras colágenas, principalmente colágeno tipo I (un 90%), aunque también tipo III y V. Además, dicha matriz contiene glucoproteínas minoritarias, como la osteonectina (proteína que favorece el depósito de calcio y fosfato), la osteocalcina (un marcador de diferenciación osteoblástica tardía, que actúa también como modulador endocrino del metabolismo hidrocarbonado) y la osteopontina (implicada en la mineralización y en la adherencia de los osteoclastos al hueso), así como nanocristales de hidroxipatita ($[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$). La zona periférica de esta matriz se denomina borde osteoide, principalmente constituido por colágeno no calcificado [1, 3].

Las células óseas (Fig.1) comprenden:

- Células osteoprogenitoras: Son de origen mesenquimal y multipotentes con capacidad proliferativa y diferenciadora a osteoblastos.

- Osteoblastos: Son células derivadas de las células osteoprogenitoras, cuya función principal es la formación ósea a través de la síntesis de fibras de colágeno y otras proteínas no colágenas de la matriz. Poseen niveles elevados de fosfatasa alcalina (FA), una enzima implicada en la mineralización y marcador de la formación ósea. Cuando no son metabólicamente activos, permanecen asociados a la superficie ósea en forma de células aplanadas de revestimiento (en inglés, *lining cells*); mientras que cuando se activan, se localizan en el borde osteoide [4].

- Osteocitos: Son osteoblastos diferenciados que quedan embebidos en la matriz ósea calcificada. Conforman el 90-95% del total de las células en el hueso adulto, siendo el tipo celular óseo más longevo. Residen en espacios denominados lagunas y emiten prolongaciones citoplasmáticas que conectan con otros osteocitos e incluso con osteoblastos en la superficie ósea. Los osteocitos son considerados los verdaderos orquestadores del remodelado óseo (proceso que se detalla en el apartado 1.1.4.) gracias a sus propiedades mecano-sensoras y a la síntesis, en exclusiva, de esclerostina [5]. Esta proteína inhibe la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, un

importante modulador de la proliferación y diferenciación osteoblástica y osteoclástica (ver apartado 1.2.) [6].

- Osteoclastos: Son células multinucleadas procedentes de la línea mieloide hematopoyética, cuya función es la resorción del hueso (tanto su matriz como el mineral). Su morfología resulta irregular, con un gran número de prolongaciones celulares en la superficie adyacente al hueso (borde en cepillo). A través de la secreción de enzimas hidrolíticas favorecen la osteolisis (ver apartado 1.1.4.)[7].

1.1.2. Organización del tejido óseo

El hueso, de acuerdo a su estructura macroscópica, se denomina cortical o compacto y trabecular o esponjoso. El primero forma una masa sólida y densa en la superficie ósea; mientras que en el interior, el hueso trabecular está formado por una red tridimensional de estructuras ramificadas denominadas trabéculas que delimitan el espacio ocupado por la médula ósea. El 80-90 % del volumen del hueso cortical está calcificado (de ahí su función mecánica y protectora), mientras que en el trabecular (con funciones metabólicas y homeostáticas) este porcentaje varía del 15-25 %. A su vez, el hueso puede clasificarse como primario o no lamelar (desorganizado e inmaduro) y secundario o lamelar (con una disposición de fibras colágenas organizadas y mineralizado) [8].

Según su forma anatómica, los huesos se definen como: planos, como los del cráneo; cortos, como los de los cuerpos vertebrales; y largos, constituidos por dos extremos denominados epífisis y una zona central de forma cilíndrica denominada diáfisis. La transición entre ambas zonas posee forma cónica y se denomina metáfisis [1].

1.1.3. Formación ósea en el desarrollo

Durante el desarrollo embrionario y la reparación de fracturas, la formación ósea tiene lugar a través de dos mecanismos principales, denominados osificación intramembranosa (huesos planos y largos) y osificación endocondral (huesos largos).

La osificación intramembranosa tiene lugar en localizaciones del esqueleto genéticamente predeterminadas, donde grupos de células osteoprogenitoras se condensan sobre una capa de tejido mesenquimal altamente vascularizada, diferenciándose a células osteoblásticas que sintetizan y mineralizan la matriz ósea [9].

La osificación endocondral consiste en el reemplazo de un molde de cartílago hialino, sintetizado previamente por células mesenquimales, por tejido óseo en las epífisis de los huesos largos. Este molde cartilaginoso presenta una estructura

denominada placa de crecimiento metafisaria, en la que se distingue una capa superior donde los condrocitos se encuentran en fase de proliferación; una intermedia donde éstos comienzan a diferenciarse (condrocitos pre-hipertróficos); y otra más profunda con condrocitos hipertróficos. Éstos sintetizan factores, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (en inglés, *VEGF*). Durante el desarrollo embrionario, el VEGF promueve la penetración de vasos sanguíneos en la diáfisis (centro de osificación primario) o en las epífisis (centros de osificación secundarios), permitiendo así el acceso de células osteoprogenitoras y la sustitución del cartílago por tejido óseo. En humanos, debido al cambio hormonal durante la pubertad, las placas metafisarias se calcifican, deteniéndose el crecimiento óseo [10, 11].

1.1.4. Modelado y remodelado óseo

Se conoce como modelado óseo la formación de hueso nuevo a partir de la actividad osteoblástica sin aumento de la resorción ósea. Este proceso es muy activo durante el crecimiento y produce cambios en el tamaño y la forma de los huesos.

El remodelado óseo ocurre a lo largo de la vida, íntimamente asociado a la actividad motora, siendo absolutamente necesario para la reparación de microfracturas y contribuyendo a la homeostasis fosfocálcica. Este proceso tiene lugar en las denominadas unidades de remodelado óseo (en inglés, *BRUs*) y sigue una secuencia cíclica cuya duración aproximada es de 6 meses en humanos [12]. Cada ciclo incluye 4 fases: **Activación**, en la que los osteocitos responden a estímulos mecánicos (microfracturas o falta de carga mecánica) o endocrinos liberando moléculas pro-apoptóticas que inducen la retracción de las células de revestimiento de la superficie mineralizada y el reclutamiento y activación de precursores osteoclasticos. Éstos se diferencian a osteoclastos por la acción del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando del receptor activador del factor nuclear- κ B (RANKL), producidos por células de estirpe osteoblástica. El acceso de los osteoclastos a la superficie ósea inicia la **Fase de resorción** [12, 13]. En esta fase, que dura unas 4 semanas, los osteoclastos quedan adheridos a la superficie mineralizada a través de integrinas y la osteopontina, creando un compartimento sellado acidificado por el bombeo de H^+ dependiente de ATP, lo que favorece la secreción y actividad de enzimas como la fosfatasa ácida tartrato-resistente (FATR), la catepsina K (Cat K) y metaloproteasas que degradan la matriz ósea. Este proceso determina la formación de lagunas de resorción denominadas de *Howship* [14]. **Fase reversa**: A continuación, los osteoclastos entran en apoptosis y la *laguna de Howship* es invadida por pre-osteoblastos sobre los que actúan diversos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, promoviendo su diferenciación a osteoblastos maduros. En esta fase de

unas 2 semanas de duración, destaca la activación de factores de transcripción que sirven además como marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica, el factor de transcripción 2 relacionado con RUNT (*Runx2*) y Osterix (*Osx*). La expresión de *Runx2* es crucial para el desarrollo óseo, ya que induce la expresión de los principales genes implicados en la formación de la matriz ósea, *Col1a1*, que codifica para el colágeno de tipo I, *osteopontina* y *osteocalcina* (*Oc*) [15-19]. *Osx* actúa posteriormente a *Runx2*, permitiendo la diferenciación de pre-osteoblastos a osteoblastos maduros [20, 21]. **Fase de formación:** Durante 10 días aproximadamente se completa la formación del borde osteoide que, posteriormente, se mineraliza en un proceso que dura 1-3 meses facilitado por enzimas tales como la FA. Una vez completada esta fase, el 10-20 % de los osteoblastos permanecen embebidos en la matriz mineralizada como osteocitos, o en la superficie como células de revestimiento inactivas, mientras que la mayoría mueren por apoptosis [22].

En el hueso adulto sano, existe un equilibrio entre la cantidad de hueso formado y la de resorbido. Patologías óseas prevalentes como la osteoporosis (OP), la osteogénesis imperfecta y la osteomalacia cursan con un balance negativo de remodelado óseo (es decir, predomina la resorción); mientras que las patologías asociadas a un balance positivo de este remodelado (con predominio de la mineralización), como la osteopetrosis, la esclerosteosis o la enfermedad de Van Buchem son menos frecuentes [23].

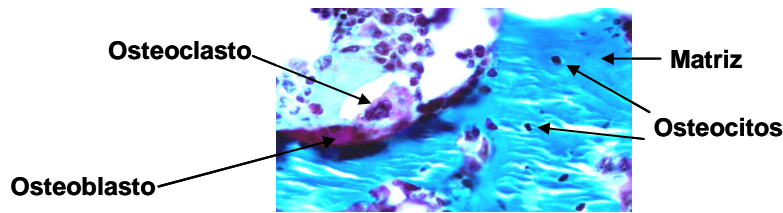
1.1.4.1. Regulación del remodelado óseo y de la formación ósea

La actividad de las *BRUs* se regula tanto por factores endocrinos (sistémicos) como por factores locales, así como por estímulos mecánicos.

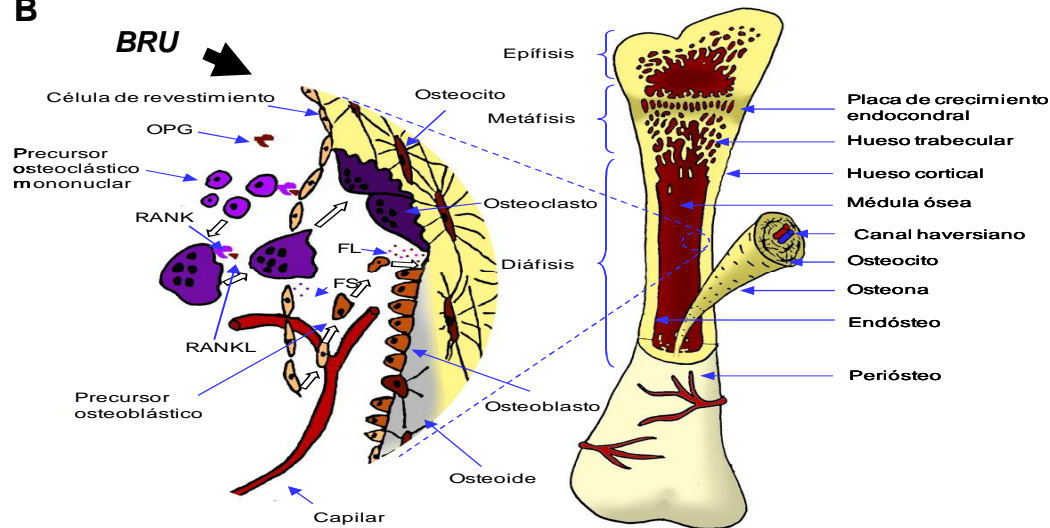
Factores endocrinos

La **hormona paratiroidea (PTH)** es el factor endocrino regulador por excelencia de la homeostasis fosfocálcica. Esta hormona mantiene la calcemia mediante la estimulación de la resorción ósea, el incremento de la reabsorción tubular renal de calcio y la producción de calcitriol que favorece la absorción intestinal de este catión. Administrada de forma continua, la PTH incrementa fundamentalmente el número y la actividad de los osteoclastos; sin embargo, cuando su administración es intermitente, favorece el remodelado óseo con predominio de la formación ósea a través de su acción sobre la proliferación y diferenciación de las células de estirpe osteoblástica (ver apartado 1.3.2.) [24, 25].

A



B



C

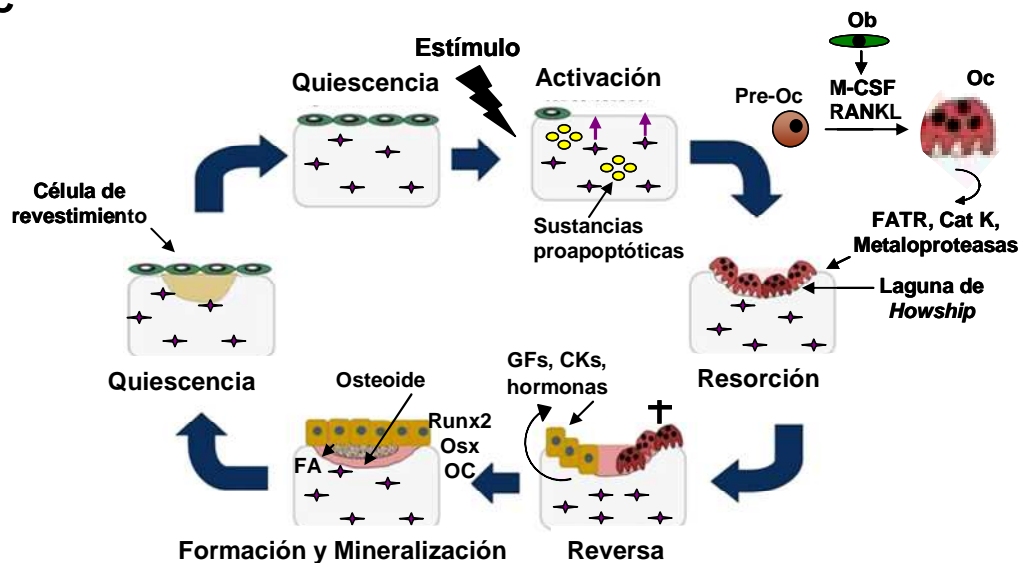


Fig.1. Celularidad ósea y su papel en el remodelado óseo. (A) Imagen representativa de los distintos tipos de células óseas en una vértebra de ratón (40x, tinción tricrómico de Goldner). (B) Esquema morfológico de un hueso largo. Unidad de remodelado óseo (*BRU*): tipos celulares y sus estadios de diferenciación. FS, factores secretados; FL, factores liberados reguladores del remodelado óseo; OPG, osteoprotegerina; RANK, receptor activador de NF-κB; RANKL, ligando del receptor activador de NF-κB. (C) Esquema del proceso de remodelado óseo. Fases de quiescencia, resorción, reversa, formación y mineralización. Pre-Oc, pre-osteoclasto; Oc, osteoclasto; Ob, osteoblasto; GFs, Factores de crecimiento; CKs, citoquinas. [Esquema adaptado y modificado de Compston JE, *Physiol Rev*. 2001; 81: 419-47].

La **calcitonina** es una hormona producida por las células parafoliculares de la glándula tiroidea que reduce la actividad resorptiva de los osteoclastos sin disminuir su número. También se le atribuyen efectos antiapoptóticos en los osteoblastos [26, 27].

La **vitamina D₃** o **calcitriol [1,25(OH)₂, colecalciferol]** es una hormona esteroidea que, además de favorecer la absorción intestinal del calcio y del fosfato, estimula la síntesis osteoblástica de FA y de OC promoviendo la formación ósea. Por otro lado, esta hormona también está implicada en la regulación génica de factores que inducen la osteoclastogénesis [28, 29].

Las **hormonas sexuales** desempeñan un papel destacado en el remodelado óseo. Mediante la señalización a través de sus receptores intracelulares, tanto andrógenos como estrógenos disminuyen la osteoclastogénesis y modulan la apoptosis, reduciéndola en osteoblastos e incrementándola en osteoclastos [30].

Los **glucocorticoides (GCs)** son hormonas esteroideas que a dosis farmacológicas inhiben la diferenciación de las células mesenquimales a células de estirpe osteoblástica mediante el bloqueo de la expresión de *Runx2*, *Col1a1*, *Oc*, y de factores de crecimiento como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I) y la proteína morfogenética ósea-2 (en inglés, *BMP-2*); además de inducir su apoptosis a través de la activación de la caspasa-3 [31]. Por otro lado, los GCs promueven la síntesis de RANKL y M-CSF aumentando la diferenciación de los osteoclastos, e inhibiendo su apoptosis [32, 33]. Se ha demostrado que existe una asociación entre la terapia glucocorticoidea intensiva y el aumento del riesgo de fracturas óseas [34].

La **insulina** es una hormona con efecto dual en el hueso. Por un lado, estimula la síntesis de proteínas de la matriz y favorece su mineralización [35]; mientras que por otro, se autoregula y regula el metabolismo de la glucosa en parte reduciendo la producción de osteoprotegerina (OPG) en los osteoblastos y favoreciendo la resorción ósea. Este proceso libera OC decarboxilada de la matriz al plasma, que actúa como una hormona induciendo la producción y la secreción de insulina por las células β -pancreáticas [36].

La hormona tiroidea triyodotironina (**T₃**) posee un efecto bifásico sobre el hueso ya que, por un lado, favorece su mineralización, mientras que también estimula la resorción ósea aumentando el número y la actividad de los osteoclastos. De ahí que, tanto un exceso como una deficiencia de T₃, resulte en un incremento del riesgo de fracturas [37].

La hormona de crecimiento (**GH**) estimula la formación y mineralización ósea de manera directa (induciendo la proliferación y diferenciación de los osteoblastos) o

indirecta, a través del aumento de IGF-I sistémico y local en el hueso (Fig.2) y la síntesis de la vitamina D₃ [38].

Factores locales

Los **IGFs** son los factores de crecimiento más abundantes en la matriz ósea, de la que son liberados durante la resorción. El sistema IGF está formado por IGF-I e IGF-II, los receptores mayoritarios de ambos factores, IGF-IR e IGF-IIR, respectivamente, y las proteínas transportadoras o proteínas de unión a IGF (en inglés, IGFBPs) que exhiben una alta afinidad por ambos IGFs, actuando como activadores o inhibidores de su acción [39]. Mientras que el IGF-II regula el crecimiento durante la etapa embrionaria, el IGF-I actúa predominantemente durante el desarrollo postnatal [40]. No obstante, ambos factores poseen actividad anabólica, especialmente el IGF-I, cuya síntesis ósea se regula en parte por la acción de la GH y de la PTH (Fig.2) [41]. La descripción del mecanismo de acción del IGF-I en el hueso se trata en el apartado 1.3.1.2.

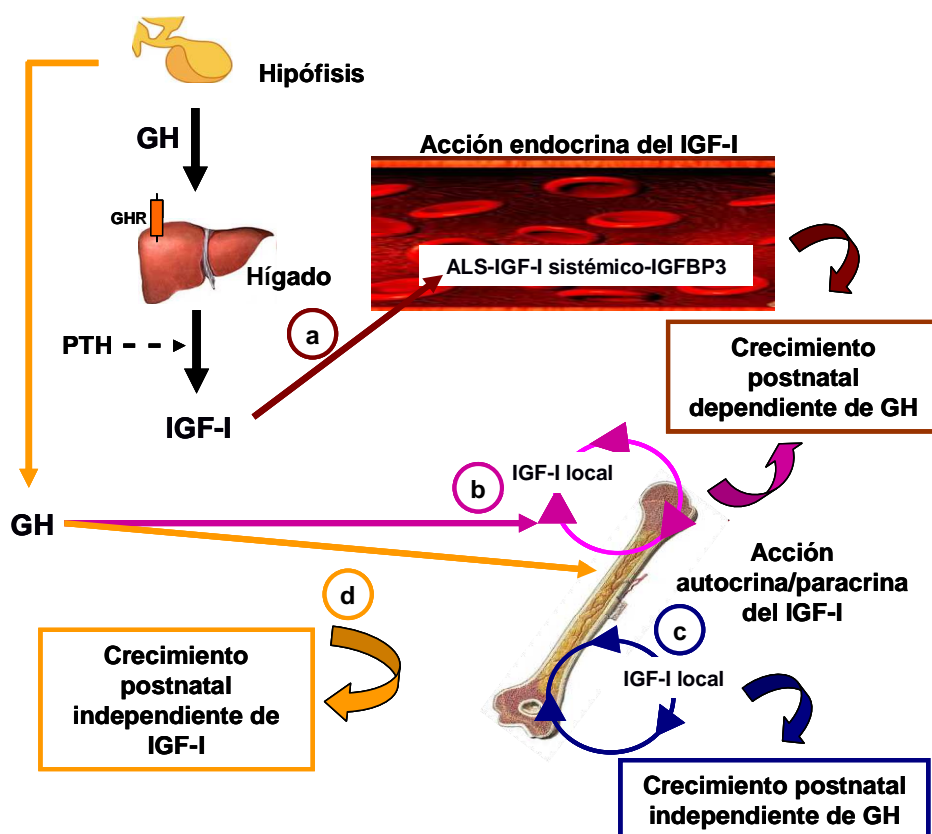


Fig. 2. Esquema representativo de la implicación de la GH y del IGF-I en el metabolismo óseo. Producción del IGF-I sistémico con acciones endocrinas (a) regulada en parte por la GH y la PTH. GHR; receptor de GH. Para su transporte por el torrente sanguíneo, el IGF-I forma un complejo ternario con 2 proteínas transportadoras, la IGFBP-3 (proteína transportadora de IGF-3) y la ALS (subunidad ácido-lábil); producción de IGF-I local con acciones autocrinas y paracrinas, dependientes (b) o independientes (c) de la GH, en el hueso. Acción directa de la GH sobre el hueso (d).

El factor de crecimiento transformante β (**TGF- β**) es sintetizado por los osteoblastos en los que ejerce efectos autocrinos sobre la proliferación, diferenciación y la síntesis de matriz, además de inhibir la resorción ósea disminuyendo la osteoclastogénesis y promoviendo la apoptosis de los osteoclastos [42].

Las **BMPs** son proteínas de la familia del TGF- β producidas por los osteoblastos. Concretamente, la BMP-2 y la BMP-7 inducen la transcripción de *Runx2* y *Osx* en células osteoprogenitoras, promoviendo su diferenciación a osteoblastos [43].

Las prostaglandinas (**PGs**), especialmente la E2 (PGE₂), son también abundantes en el hueso, donde son sintetizadas por los osteoblastos. Por un lado, estimulan la pérdida de masa ósea asociada a procesos inflamatorios; mientras que, a bajas concentraciones, son capaces de aumentar la formación y la regeneración ósea, favoreciendo la proliferación y diferenciación de células de estirpe osteoblástica [44].

El factor de crecimiento de fibroblastos (en inglés, **FGF**), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (en inglés, **PDGF**) y el **VEGF** actúan como potentes mitógenos sobre las células óseas [45].

La proteína relacionada con la PTH (**PTHrP**) es también sintetizada y secretada por las células osteoblásticas. La PTHrP actúa sobre estas células a través del receptor común para la PTH y la PTHrP, denominado tipo 1 (PTH1R), promoviendo su diferenciación a osteoblastos maduros. Además, la PTHrP ejerce acciones anti-apoptóticas en osteoblastos y osteocitos. De modo análogo a lo observado con la PTH, la exposición continua a la PTHrP *in vivo* estimula la osteoclastogénesis y la resorción ósea de modo predominante [46]. En el apartado 1.3.3. se detallan las acciones óseas de la PTHrP.

Las **citoquinas**, como la interleuquina (IL)-1, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , producidas por células del sistema inmune son importantes reguladores de la actividad osteoblástica y osteoclástica, promoviendo la resorción ósea en procesos inflamatorios. Por otro lado, la IL-4, la IL-10 y la IL-13 poseen el efecto contrario, bloqueando la activación osteoclástica [47, 48].

Las **proteínas WNT** (información más detallada en el apartado 1.2.1.) ejercen un papel destacado en la diferenciación osteoblástica. WNT3a y WNT10 son las más importantes activadoras de la vía de señalización Wnt/ β -

catenina. Estas proteínas potencian la osteoblastogénesis en detrimento de la adipogénesis a partir de progenitores de la médula ósea, modulando *Runx2* y el receptor activador del factor proliferador de peroxisomas γ (*Ppar γ*) [49].

Estimulación mecánica

Se ha demostrado que tanto las células de revestimiento como los osteoblastos maduros y los osteocitos responden a estímulos mecánicos. Sin embargo, los osteocitos (interconectados en el interior del hueso calcificado) constituyen la diana celular más importante de dichos estímulos para activar el remodelado óseo [50]. El osteocito parece responder a los estímulos mecánicos a través de su cuerpo celular, sus prolongaciones dendríticas y su cilio [51]. La microfractura ósea o la hipoxia desencadenan la activación del remodelado óseo por un mecanismo que implica la apoptosis de los osteocitos –con aumento de expresión de la proteína pro-apoptótica Bax- y la liberación de RANKL que recluta a los osteoclastos e inicia la resorción ósea. Sin embargo, en condiciones de estimulación mecánica, los osteocitos emiten señales anti-osteoclastogénicas, liberando TGF- β , óxido nítrico (NO) y PGs, que promueven la formación ósea [52]. La PGE₂ a bajas concentraciones activa la vía Wnt/ β -catenina favoreciendo la estabilización de la β -catenina en el núcleo y, de ese modo, la osteoblastogénesis y la conexión entre los osteocitos a través de conexinas [53]. En ausencia de estímulos mecánicos, los osteocitos mantienen inhibida la formación ósea secretando inhibidores de la vía citada, esclerostina y proteínas Dickkopf (DKK) [54].

1.1.4.2. Mecanismos de acoplamiento entre la resorción y la formación ósea

En condiciones normales en el adulto, la cantidad de hueso resorbido es reemplazada por hueso nuevo en la misma cantidad y localización. Esto se debe a mecanismos de acoplamiento estrechamente regulados por factores locales y por las interacciones célula-célula en las *BRUs*. En la fase de activación del ciclo de remodelado óseo, las células de estirpe osteoblástica en dichas unidades multicelulares liberan citoquinas como la IL-1 y la IL-6 y factores quimiotácticos como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que promueven el reclutamiento de los precursores osteoclásticos [55]. Por otra parte, al inicio de la fase de resorción existe una comunicación íntima entre pre-osteoclastos y las células del linaje osteoblástico que expresan RANKL [56]. El RANKL pertenece a la familia del TNF y presenta gran afinidad por su receptor RANK en la membrana de los precursores osteoclásticos; esta interacción desencadena la diferenciación osteoclástica. Factores mencionados anteriormente, como la PTH, la PTHrP, las hormonas tiroideas, el calcitriol, o las PGs,

regulan la resorción ósea en parte a través de RANKL [57]. Para finalizar la actividad resorptiva de los osteoclastos, los osteoblastos diferenciados expresan y secretan osteoprotegerina (OPG), un receptor de la misma familia de receptores de TNF, similar a RANK, que actúa como un receptor señuelo para RANKL impidiendo su unión a RANK, además de inducir la apoptosis de los osteoclastos [58]. De este modo, el cociente RANKL/OPG controla en gran parte el remodelado óseo. Sin embargo, existen otros mecanismos mediadores de la comunicación osteoclasto-osteoblasto, entre ellos: 1) La FATOR producida y secretada por los osteoclastos durante la resorción, que puede actuar como estímulo para los osteoblastos e iniciar la formación ósea [57]; 2) la secreción de esfingosina-1-fosfato por los osteoclastos, que promueve la migración y supervivencia de los osteoblastos [59]; 3) la comunicación bidireccional osteoclasto-osteoblasto, basada en la expresión del ligando efrina B2 (EphB2) en los osteoclastos y su receptor Efrina B4 (EphB4) en la membrana de los osteoblastos. Fruto de esta interacción, se genera una señalización anti-osteoclastogénica y pro-osteoblastogénica [55].

Además, la liberación de factores de crecimiento durante la fase resorptiva (entre ellos, TGF- β e IGF-I) estimula la diferenciación de precursores osteoblásticos, favoreciendo las fases de formación ósea y de mineralización en el proceso de remodelado. La esclerostina, codificada por el gen *Sost* e inhibidor de la vía Wnt citada, es secretada por los osteocitos finalizando el proceso de formación ósea y dando lugar a la fase quiescente, en la que las células de revestimiento permanecen unidas entre sí a través de cadherinas y conexinas [57].

1.2. La vía de señalización Wnt

Esta vía de señalización debe su nombre a los ligandos efectores que comprenden un conjunto de glicoproteínas denominadas WNT, las cuales activan diferentes procesos celulares (principalmente, la proliferación y la diferenciación) en varios tejidos del organismo incluido el hueso. En éste, dichas proteínas conforman una red de señales intracelulares que, en combinación con otros factores y vías de señalización, ejercen un importante control del remodelado óseo.

1.2.1. Las proteínas Wnt

En los años 80 se identificó *int1*, un protooncogen sobreexpresado en tumores de mama de ratón tras la infección por el virus del tumor mamario de ratón (MMTV) [60]. Investigaciones posteriores identificaron a *int1* como el homólogo de *Wingless*, un gen de polaridad segmentaria asociado a la pérdida de las alas durante el desarrollo

de *Drosophila melanogaster*. Con el fin de evitar confusiones, se estipuló un término híbrido, *Wnt*, como denominación común para ambos genes [61].

Las WNT son glicoproteínas de 300-400 aminoácidos (con un elevado contenido en residuos cisteína) y un peso molecular aproximado de 40 KDa. Su extremo N-terminal está constituido por varias estructuras α -hélice con 5 puentes disulfuro y una secuencia específica que les confiere la capacidad de ser secretadas; mientras que su dominio C-terminal contiene 2 estructuras de lámina β y 6 puentes disulfuro. Modificaciones postraduccionales (glicosilaciones y acilaciones, entre otras) en el retículo endoplásmico les confieren hidrofobicidad y capacidad de anclaje tanto a la membrana plasmática como a la matriz extracelular. La glicosilación juega un papel esencial para el plegamiento correcto de WNT y su secreción, mientras que la posterior acilación –con ácido palmítico y ácido palmitoleico- es absolutamente necesaria para su actividad señalizadora. Tanto la acción de lipasas como la formación de complejos multiproteicos a modo de micelas se requieren para la solubilización y difusión de las proteínas WNT [62].

Se conocen 19 genes que codifican el mismo número de proteínas WNT, tanto en roedores como en humanos [63]. Estas proteínas se clasificaron inicialmente de acuerdo a su capacidad para duplicar (WNTs canónicas) o no (WNTs no canónicas) el eje dorsal en embriones de *Xenopus*. De este modo, entre las proteínas canónicas encontramos a: WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A y WNT10B; mientras que entre las no canónicas se encuentran: WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT11 y WNT16 [64]. A continuación, se describen los componentes y los mecanismos moleculares de la vía Wnt canónica o Wnt/ β -catenina (la más estudiada) y de las vías Wnt no canónicas. Esta clasificación es utilizada para simplificar, ya que existen proteínas WNT no canónicas que actúan como canónicas y viceversa.

1.2.2. La vía Wnt canónica

Esta vía de señalización es esencial en diversos procesos biológicos, como el desarrollo pre y postnatal y la homeostasis tisular. En estas situaciones, la vía Wnt canónica actúa como reguladora de la proliferación celular, la diferenciación de células mesenquimales y la polaridad celular [65]. La existencia de alteraciones en el funcionamiento de esta vía está permitiendo dilucidar algunos de los mecanismos moleculares implicados en algunas patologías osteoarticulares. A continuación, se describen los componentes moleculares de esta vía de señalización y su función dentro de la misma.

1.2.2.1. Componentes de la vía Wnt canónica

Receptores de membrana: Son las proteínas Frizzled (FZ), de las que existen hasta 10 tipos diferentes en humanos y 9 en ratón. Estos receptores constituidos por 7 segmentos transmembrana interaccionan con las proteínas WNT mediante un dominio rico en cisteínas (en inglés, CRD) en la superficie extracelular [66]. Además, en la membrana celular existen proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP4, LRP5 y LRP6), siendo LRP5/6 correceptores de FZ, y LRP4 un coadyuvante en la señalización mediada por inhibidores de la vía Wnt [67]. Otro tipo de correceptor es Kremen que interacciona con DKK1 (se describen más adelante) y LRP6, lo que provoca la internalización de FZ e inhibición de la vía [68].

Efectores citosólicos: En el citosol, destaca un complejo multiproteico inhibidor de la señalización de Wnt (complejo de destrucción), integrado por la glucógeno sintetasa quinasa-3 β (GSK3 β), la axina, la caseína quinasa-1 α (CK1 α) y la proteína responsable de la poliposis adenomatosa de colon (en inglés, APC). Este complejo se encarga de la degradación de la proteína clave en la señalización de la vía Wnt canónica, la β -catenina. La axina actúa como proteína de anclaje del resto de proteínas que integran el complejo de destrucción y, además, promueve la fosforilación del residuo S45 de la β -catenina citosólica por la CK1 α . Esta fosforilación permite la de los residuos T41, S37 y S33 de la β -catenina por la GSK3 β [69], dando lugar al reconocimiento de su extremo N-terminal por la APC, que conduce a su degradación en el proteasoma [70]. Dishevelled (DVL) es otra proteína presente en el citosol que resulta esencial para la correcta señalización de FZ. Tras la activación de la vía por WNT, FZ recluta DVL en la membrana plasmática donde interacciona con el complejo de destrucción favoreciendo su inactivación (este aspecto se describe más adelante).

Efectores nucleares: En el núcleo se encuentran el factor de transcripción de célula T (en inglés, TCF) y el factor de unión al potenciador linfóide (en inglés, LEF), que forman un complejo con capacidad de unión a factores de transcripción como la β -catenina para promover la expresión génica [71].

Inhibidores extracelulares: Incluyen a las proteínas DKKs citadas, de las cuales DKK1 constituye el inhibidor de la vía Wnt mejor caracterizado hasta el momento; la esclerostina de los osteocitos, también citada anteriormente; las proteínas secretadas relacionadas con FZ (en inglés, SFRPs); y el factor inhibidor de WNT (en inglés, WIF). Los dos primeros bloquean la señalización a través de LRP5/6, mientras SFRP y WIF impiden la unión de WNT a FZ [72].

Inhibidores nucleares: Se han descrito factores nucleares capaces de impedir la transcripción mediada por β -catenina, entre ellos: los factores Ctnbip1/Icat y

Groucho, que impiden la unión de β -catenina a TCF; y Cby/Chibby que induce la translocación de β -catenina del núcleo al citosol [73].

1.2.2.2. Mecanismos moleculares implicados en la señalización Wnt canónica

La interacción de FZ con LRP5/6 es suficiente para activar la señalización de β -catenina independientemente de WNT; sin embargo, parece que la unión de los ligandos WNT promueve el ensamblaje de un mayor número de correceptores LRP5/6 que amplificarían la señal. Así, WNT, además de inducir la interacción FZ-DVL, activa la síntesis de fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP_2), que promueve la formación de un complejo de señalización formado por varias moléculas de LRP6 ensambladas con clatrina y la proteína adaptadora-2 (AP-2), provocando así la amplificación de la señal. [74, 75]. En este contexto, estudios recientes demuestran una mayor eficiencia de la señalización WNT a través de LRP6 respecto a la obtenida con LRP5, probablemente por la formación de estos complejos [76].

El complejo FZ-DVL secuestra a la axina y, en consecuencia, al complejo de destrucción de la β -catenina citado. De este modo, la GSK3 β y la CK1 pueden fosforilar a LRP5/6 en motivos altamente conservados constituidos por cuatro residuos de prolina, dos serinas y un residuo aleatorio (PPPSPxS) [77]. La estabilización de la β -catenina en el citosol depende de la fosforilación (inactivación) de la GSK3 β . Existen varios modelos que hipotetizan que dicha inactivación ocurre por la acción de los propios motivos PPPSPxS [78, 79], por DVL que activa a la proteína quinasa B (AKT) y fosforila a la GSK3 β en la Ser9 [80, 81], o por el almacenamiento de la GSK3 β en cuerpos multivesiculares [82]. Recientemente, se ha propuesto que podrían existir dos conjuntos de GSK3 β en las células, uno sensible a AKT asociado a la membrana plasmática y otro dependiente de la axina en el complejo de destrucción citosólico [83]. De cualquier modo, la inactivación de la GSK3 β evita la fosforilación de la axina y, como consecuencia, la de β -catenina permitiendo su estabilización en el citoplasma y posterior translocación al núcleo (Fig. 3A, dcha) [74].

En ausencia de activación de WNT, el complejo transcripcional TCF/LEF se encuentra unido a Groucho, impidiéndose la transcripción de los genes finales de la vía (Fig. 3). Estos genes son específicos para cada tipo celular; en los osteoblastos, destacan: *c-myc*, *c-jun*, *ciclina D1* (*Ccnd1*), *Runx2*, *OPG*, *RANKL* (inhibidor), *axina2*, *Lef1* y *conexina43* (*Cx43*). La β -catenina en el núcleo desplaza a Groucho, activando así la transcripción génica (Fig.3A, dcha) [84].

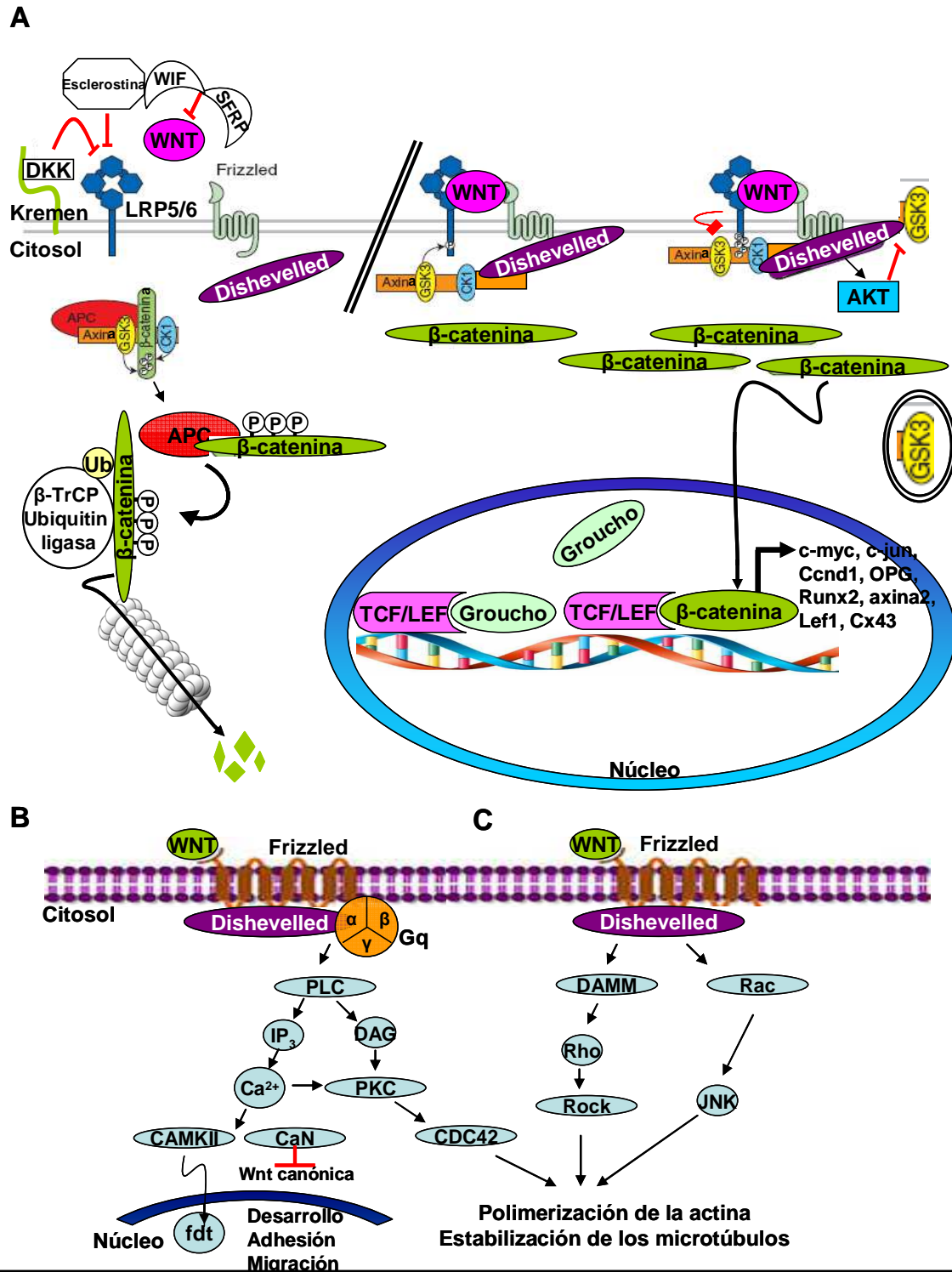


Fig.3. Esquema representativo de las diferentes vías de señalización Wnt. (A) Vía Wnt canónica inactiva (izq.) o activada por ligandos WNT (dcha). P, fosfato; Ub, residuo de ubiquitina. (B) Vía Wnt/ Ca^{2+} (no canónica). PLC, fosfolipasa C; IP_3 , fosfatidilinositol (1,4,5)-fosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinasa C; CAMKII, calmodulina quinasa II; CaN, calmodulina; CDC42, proteína de control de la división celular 42; fdt, factores de transcripción. (C) Vía Wnt de la PCP (no canónica). DAMM, proteína activadora de la morfogénesis asociada a DVL; Rock, proteína quinasa asociada a Rho; JNK, proteína quinasa c-Jun N-terminal.

1.2.2.3. La vía Wnt canónica y el remodelado óseo

Actualmente, se considera a la vía Wnt canónica como un importante mecanismo modulador del remodelado óseo. Así, mutaciones con pérdida de función en el gen *Lrp5* originan el síndrome de OP-pseudoglioma, caracterizado por la aparición precoz de osteoporosis [85]. Por otro lado, en este gen existe identificada otra mutación, la G171V, que impide la unión de esclerostina y DKK1, y origina un fenotipo de masa ósea elevada [86]. En cuanto a *Lrp6*, existen polimorfismos asociados a una densidad mineral ósea (DMO) baja [87]. La haploinsuficiencia para *Lrp6* agrava el fenotipo de los ratones con deficiencia global de *Lrp5*, sugiriendo la ausencia de redundancia entre ambos genes [88].

La unión de β -catenina a TCF/LEF regula positivamente la expresión de *OPG* en células de linaje osteoblástico, impidiendo así la diferenciación osteoclástica [89]. Sin embargo, los osteoclastos y sus precursores también son susceptibles de estimulación a través de la vía Wnt de forma paracrina y autocrina. Así, la activación de β -catenina en los pre-osteoclastos favorece su proliferación; mientras que inhibe la osteoclastogénesis en estadios tardíos. Cabe destacar además que las proteínas WNT son capaces de activar la osteoclastogénesis a través de vías de señalización no canónicas (descritas a continuación) [90]. De este modo, la señalización a través de WNT constituye un importante mecanismo de comunicación osteoblasto-osteoclasto durante el remodelado óseo.

1.2.3. Vías Wnt no canónicas

Estas vías son la vía dependiente de calcio (Wnt/ Ca^{2+}) y la de polaridad celular planar (PCP). La primera se inicia cuando los ligandos WNT no canónicos se unen a receptores FZ que, a través de la unión de DVL, promueven una cascada de señalización que libera calcio intracelular del retículo endoplásmico y activa a la proteína quinasa C (en inglés, PKC), la calcineurina y la calmodulina quinasa II. Estas proteínas activan a su vez factores de transcripción implicados en el desarrollo embrionario, en la organización tisular y en la adhesión y migración celular (Fig.3B) [91, 92]. La vía PCP se ha descrito en *Drosophila melanogaster* y en vertebrados. En esta vía, el reclutamiento de DVL tras la unión de WNT a FZ activa dos cascadas de señalización, una mediada por las proteínas Rho y ROCK y otra por Rac y Jun quinasas, ambas implicadas en la polimerización de la actina y la estabilización del citoesqueleto (Fig.3C)[92].

1.3. La osteoporosis (OP)

La OP es una patología asociada a la pérdida y/o al deterioro de la masa y la estructura ósea. Este deterioro es particularmente acusado a nivel del hueso trabecular en las vértebras, las costillas y la cadera, paralelo a un incremento en la porosidad cortical, lo que determina la susceptibilidad a fracturas [93, 94].

De acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud, la OP se define por unos valores de DMO, cuantificados por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA), que se desvían al menos 2,5 desviaciones estándar por debajo de la masa ósea promedio de la población sana joven (*T-score*) [95]. Cuando el *T-score* se encuentra entre valores de DMO de 1 y 2,5 desviaciones estándar por debajo de ese promedio se define como osteopenia.

Existen diferentes tipos de OP. Cuando no se identifica ninguna patología causal se habla de OP primaria, mientras que cuando se asocia a una serie de condiciones patológicas previamente establecidas e identificadas se habla de OP secundaria. En la tabla I, se amplía esta clasificación [96].

Tabla I. Clasificación de los tipos de OP.

Clasificación de tipos de OP	
1) Primaria	
Idiopática juvenil	Es muy rara y comienza entre los 8-14 años de edad. Suele remitir de manera espontánea o una vez alcanzada la pubertad.
Idiopática del adulto joven	En varones jóvenes y mujeres pre-menopáusicas. Evolución variable con episodios de fracturas recidivantes característicos.
Tipo I. Post-menopáusica	Ocurre en mujeres post-menopáusicas de 50 a 75 años y se caracteriza por una pérdida acelerada de hueso trabecular (remodelado óseo elevado) y un aumento en la porosidad a nivel cortical.
Tipo II. Senil o involutiva	Se detecta en ambos sexos como consecuencia de un déficit de la función osteoblástica (bajo remodelado óseo) con la edad. Se afecta tanto el hueso cortical como el trabecular.
2) Secundaria	
Asociada a patologías múltiples	Endocrinas: estados hipogonadales, Diabetes mellitus (DM) , enfermedad de Cushing, hiperparatiroidismo, acromegalia, insuficiencia renal Gastrointestinales: malabsorción, celiacía Genéticas: hemocromatosis, osteogénesis imperfecta, porfirias Hematológicas: mieloma, leucemias, linfomas Reumatológicas: artritis reumatoide Transplante de órganos
Fármacos y drogas	Anticoagulantes, glucocorticoides, inmunosupresores, alcohol

La OP es especialmente prevalente en mujeres post-menopáusicas, pero también tiene lugar en varones a partir de los 50 años (osteoporosis involutiva) como resultado de la deficiencia estrogénica en mujeres y la asociada a la edad en ambos sexos. La deficiencia de hormonas sexuales podría interactuar con el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (en inglés, ROS) y la inflamación con la edad, favoreciendo la reducción de la capacidad proliferativa y diferenciadora de las células osteoprogenitoras y las alteraciones del remodelado óseo [97, 98].

En la OP son comunes las fracturas como consecuencia de la baja calidad ósea. Algunos tipos de fractura requieren hospitalización, produciendo una discapacidad permanente en aproximadamente un 50% de los pacientes y llegando a ser mortales en el 20% de los casos [95]. Estudios epidemiológicos han identificado diversos factores de riesgo que determinan la mayor probabilidad de desarrollar OP: 1) más de 10 años tras la menopausia; 2) antecedentes de fracturas previas; 3) historia familiar de OP; y 4) la edad [99]. Otros factores, como el sedentarismo, el abuso de alcohol, el tabaquismo o el uso crónico de corticosteroides contribuyen a acelerar la pérdida de masa ósea. El considerable impacto socioeconómico de la OP constituye actualmente un reto para el desarrollo de terapias eficaces en esta patología (según se describe en el apartado 1.3.2.).

La OP se inicia por un desacoplamiento entre la resorción y la formación ósea. Se pueden dar varias situaciones: 1) la formación ósea tiene lugar pero no es capaz de restituir por completo la laguna de resorción (alto remodelado); 2) la laguna de resorción permanece prácticamente intacta con el ciclo de remodelado detenido en la fase reversa, sin que tenga lugar nueva formación ósea (bajo remodelado) [100]; 3) existe una disminución tanto de la fase de formación ósea como de la resorptiva dando lugar a un hueso adinámico [101].

1.3.1. OP asociada a la diabetes mellitus (DM)

La DM es una patología metabólica caracterizada por una hiperglucemia crónica debida al déficit de producción y/o acción de la insulina. Esta hiperglucemia es responsable de la disfunción de órganos tales como la retina, el riñón, el sistema nervioso y el sistema cardiovascular. Además, la DM se asocia comúnmente a osteopenia/osteoporosis y al aumento de riesgo de fracturas, por mecanismos solo parcialmente caracterizados [93].

La DM tipo 1 (DM1), también conocida como DM insulino-dependiente, se caracteriza por niveles bajos de insulina y de IGF-I circulantes y se manifiesta antes de alcanzar el pico de masa ósea, mientras que la tipo 2 (DM2) -asociada a resistencia insulínica- es común en adultos. Las alteraciones esqueléticas en la DM1 incluyen:

1) Una disminución del crecimiento óseo longitudinal durante la pubertad en adolescentes; 2) la disminución de la masa ósea en cadera, cabeza del fémur y columna vertebral en adultos; 3) un incremento del riesgo de fractura; y 4) una disminución de la capacidad regenerativa ósea. Por el contrario, en la DM2, existe un incremento de la DMO, frecuentemente asociada a hiperinsulinemia, pero también una disminución de la resistencia y de la calidad ósea que justifica el aumento del riesgo de fracturas [102, 103]. No obstante, una contribución importante a este riesgo viene determinada por la frecuencia de caídas como consecuencia de retinopatía, cataratas, neuropatía y sobrepeso, comunes en la DM2 [104]. Tanto la DM1 como la DM2 exhiben características compatibles con un bajo nivel de remodelado óseo [105, 106]. Estudios más recientes evaluando marcadores de remodelado óseo en pacientes diabéticos apoyan esta hipótesis, demostrando una disminución tanto de OC (un marcador de formación ósea) y del telopéptido C-terminal del colágeno I (CTX) (un marcador de resorción) en la DM1 y una disminución de OC, TRAP y esclerostina en la DM2 [107]. Las diferencias en la DMO entre la DM1 y la DM2 se relacionan probablemente con el efecto osteogénico de la insulina, ausente en la DM1, y en las diferencias de carga mecánica debidas a la obesidad de los pacientes con DM2 [108].

Los mecanismos subyacentes a la OP en la DM no son bien conocidos. La hiperglucemia en la DM induce una menor proliferación y función osteoblástica, que promueve la pérdida de masa ósea. Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran cómo este efecto se debe, al menos en parte, a una disminución de expresión de marcadores osteoblásticos, como Runx2, OC, COL1 α , osteonectina y osteopontina. En esta situación, se incrementa la producción de M-CSF, TNF- α y RANKL, activadores de la osteoclastogénesis, así como la expresión de marcadores adipocíticos como PPAR γ , la proteína adipocítica-2, adiposina y resistina. Además, la disminución de la microvascularización ósea es una característica de la DM que agrava la pérdida de masa ósea. La calidad ósea también se ve comprometida como resultado de la producción de productos de glicosilación avanzada (AGEs) que contribuyen a la generación de estrés oxidativo, incrementando la fragilidad del hueso y el riesgo de fracturas [93]. Estos mecanismos deletéreos de la DM sobre el metabolismo y la calidad ósea se resumen en la Fig.4.

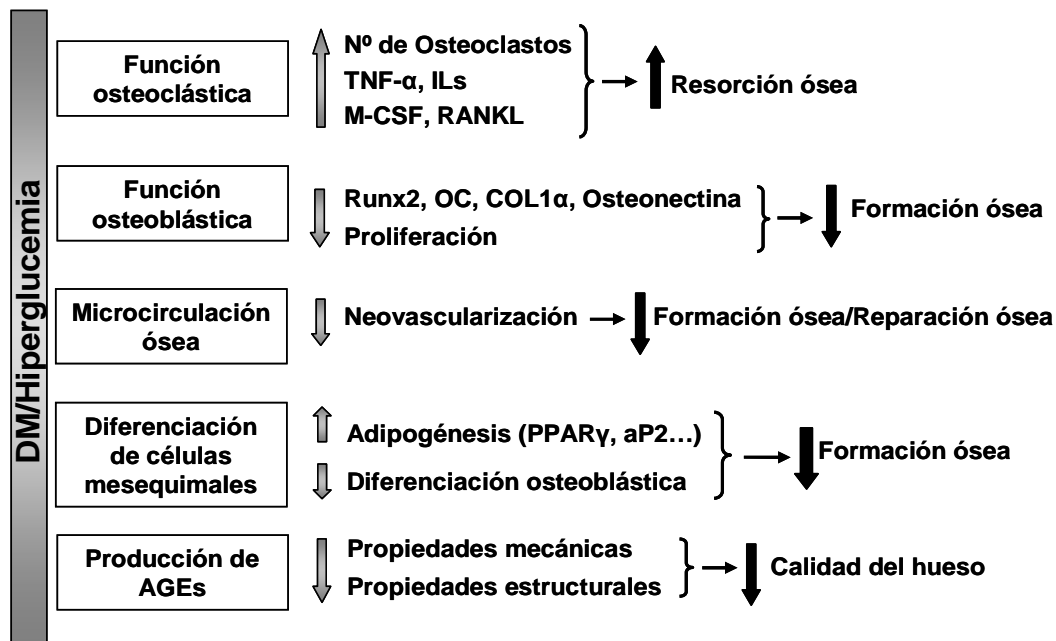


Fig. 4. Esquema representativo de los mecanismos subyacentes a la DM y a la hiperglucemia que afectan al metabolismo y la calidad ósea. [Adaptado de Wongdee K, World J Diabetes, 2011]

1.3.1.1. Papel de la autofagia en la DM

Existen evidencias de la estrecha relación entre la autofagia y la fisiopatología de la DM, fundamentalmente en la DM2. La autofagia constituye un importante mecanismo citoprotector en situaciones de estrés [109, 110]. Se caracteriza por la formación intracelular de un compartimento de doble membrana (autofagosoma) que engloba el material citoplásmico dañado a degradar, que al fusionarse con lisosomas adquiere actividad proteolítica (autofagolisosoma) [111]. La proteína relacionada con la autofagia 7 (en inglés, ATG7) es necesaria en las primeras fases de formación del autofagosoma, donde se conjuga con la proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena ligera 3 (LC3B), un marcador de flujo autofágico gracias a la conversión de su isoforma I a la isoforma II (forma lipídica presente en la membrana del autofagolisosoma) [112].

En la DM, el aumento de la síntesis de insulina en las células β -pancreáticas en respuesta a la hiperglucemia provoca estrés de retículo endoplásmico y una activación de la autofagia en estas células. Se ha demostrado que la deficiencia de autofagia en ratones insulino-resistentes agrava su fenotipo diabético [113]. La hiperglucemia, favoreciendo la acumulación de ROS y la aparición de estrés oxidativo, y también la hiperinsulinemia activan a la proteína quinasa activada por adenina monofosfato (AMPK) que inhibe a la proteína diana de la rapamicina en mamíferos (en inglés, mTOR), activándose la respuesta autofágica [114]. El estudio del papel de la autofagia en el mantenimiento de la homeostasis ósea en la DM presenta interés como posible diana terapéutica.

1.3.1.2. Papel de la insulina y del IGF-I en las alteraciones óseas en la DM

Entre los factores endocrinos y locales con acción ósea demostrada, la insulina, producida y secretada por las células β pancreáticas, y el IGF-I, mayoritariamente producido en el hígado pero también en el hueso (ver Fig.2) merecen una especial consideración en la OP relacionada con la DM.

Tanto la insulina como el IGF-I son péptidos de aproximadamente 7,5 KDa que previenen la hiperglucemia, siendo más potente en esta acción la insulina. Además de sus efectos metabólicos, ambos péptidos poseen propiedades de factores de crecimiento, afectando a la proliferación y la diferenciación celular. Tanto la insulina como el IGF-I a través de su receptor respectivo, el IR en el caso de la insulina y el IGF-IR en el caso del IGF-I, estimulan la fosforilación de los sustratos receptores de insulina (IRS1 e IRS2) que desencadenan la posterior activación de la vía de PI3K/AKT -que ejerce acciones antiapoptóticas- y de MAPK/ERK -que estimula la proliferación celular- [115] (Fig.5).

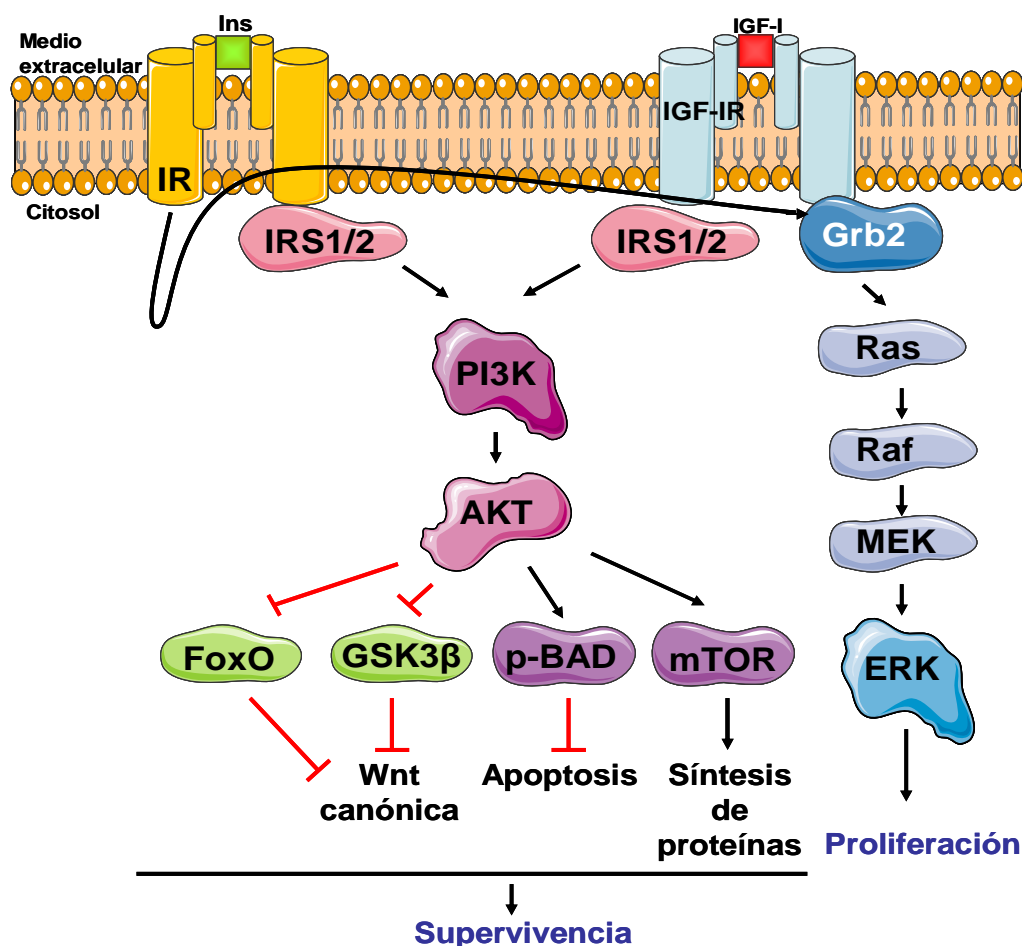


Fig.5. Esquema representativo de las vías de señalización inducidas por la insulina y el IGF-I. Ins, insulina; IR, receptor de insulina; Grb2/Sos, proteínas de unión al receptor de factores de crecimiento; Ras, Raf, MEK y ERK, cascada de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK); PI3K, fosfoinositol 3 quinasa; AKT, proteína quinasa B; FoxO, proteína O forkhead box; p-BAD, proteína BAD fosforilada. El resto de abreviaturas se describen en el texto.

Estudios en modelos de rata diabética tipo 1 sugieren la contribución del déficit de insulina a la osteopenia y a la disminución de la integridad y resistencia ósea [116-118]. En ausencia de tratamiento, se observa en estos modelos una depresión del remodelado óseo, con disminución de la actividad osteoblástica así como del número de osteoclastos [119, 120]. De acuerdo a sus características como agente anabólico, la terapia con insulina en algunos de estos modelos revierte las alteraciones histológicas y bioquímicas inducidas por la DM, incrementando la resistencia ósea [118, 121]. Sin embargo, el tratamiento con insulina no restablece los valores de DMO en pacientes con DM1 [122].

En la DM, la disminución de la disponibilidad de insulina en la circulación portal del hígado produce un descenso en el número de receptores de GH que determinan un estado de resistencia a esta hormona y una disminución de producción del IGF-I hepático (sistémico) [123]. De este modo, los pacientes con DM1 poseen niveles séricos de IGF-I significativamente disminuídos en relación a los encontrados en individuos normales o en pacientes con DM2 [124]. En los últimos años, se han desarrollado diferentes modelos transgénicos en ratón que han permitido caracterizar las alteraciones óseas asociadas al déficit de IGF-I (como ocurre en la DM). El IGF-I sistémico juega un importante papel en el desarrollo y mantenimiento de la masa ósea. Así, ratones con un bloqueo parcial en la producción de este factor presentan un desarrollo y crecimiento normales, gracias a un incremento compensatorio de GH [125]. Sin embargo, ratones con una deficiencia global en IGF-I presentan al nacer un tamaño de aproximadamente el 60% del correspondiente a sus controles, que disminuye al 30% a las 8 semanas [126]. Estos ratones se caracterizan por una menor mineralización ósea y un bajo remodelado óseo [127]. Por otro lado, ratones con deficiencia condicional de IGF-I en osteoblastos u osteocitos presentan una disminución del peso y la talla [128-130]. Los ratones carentes de IGF-IR no son viables; sin embargo, estudios en los que se bloquea este receptor en osteoblastos han permitido observar alteraciones en la proliferación, diferenciación celular y en la mineralización [131].

1.3.2. Tratamiento de la OP

Agentes antiresortivos

Los **estrógenos** constituyen la terapia sustitutiva hormonal clásica para prevenir la pérdida de masa ósea y la incidencia de fracturas en mujeres postmenopáusicas con una OP establecida o no. Estos agentes suprimen la actividad osteoclástica, de forma directa e indirecta inhibiendo la síntesis de IL-1,-6 y -7, y del TNF- α , e incrementando la producción de IGF-I y el TGF- β por los osteoblastos [12]. A

consecuencia de la probabilidad de desarrollo de tumores con esta terapia, se desarrollaron los **moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs)** que actúan como agonistas estrogénicos en el hueso pero como antagonistas de estos receptores en otros tejidos [132].

Los **bifosfonatos** constituyen la primera opción de tratamiento de la OP. Reducen aproximadamente el 50-60% de las fracturas tanto vertebrales como no vertebrales. Estos agentes se unen a la hidroxiapatita en la matriz ósea y son incorporados por los osteoclastos cuando éstos degradan dicha matriz, de manera que según su estructura química pueden provocar apoptosis (etidronato, clodronato, tiludronato) o cese de la actividad osteoclástica (pamidronato, ibandronato, alendronato, risedronato, zolendronato) [12]. El denosumab es un **anticuerpo monoclonal anti-RANKL** humanizado que bloquea eficazmente la activación de los osteoclastos y se está utilizando con éxito en la práctica clínica [133].

Actualmente, se encuentran en fase experimental el balicatib y el odanacatib, ambos **inhibidores de la catepsina K**, y el péptido similar al glucagón 2 (GLP-2), **incretina intestinal** que inhibe la actividad resorptiva a través de receptores específicos en el osteoclasto [134, 135]. Otra terapia antiresorptiva actualmente en fase II de desarrollo la constituyen los **antagonistas de los receptores de integrinas $\alpha\beta3$** , proteínas clave para el anclaje del osteoclasto a la matriz [136].

Agentes anabólicos

Las **BMPs** son potentes factores osteoinductores empleados para estimular la regeneración ósea en modelos animales, aunque su eficacia clínica es controvertida. Existen muy pocos estudios sobre la utilización de la BMP2 y la BMP7 en pacientes osteoporóticos [137]. Un ensayo clínico en fase II en mujeres postmenopáusicas actualmente se encuentra en desarrollo comparando la eficacia de la BMP2 coadministrada con un bifosfonato frente a la terapia única con bifosfonatos [138].

El **anelato de estroncio** se incorpora a los cristales de hidroxiapatita, donde el catión sustituye al calcio, suprimiendo la actividad e incrementando la apoptosis osteoclástica. Además, promueve la proliferación, la síntesis de colágeno y la actividad de FA en los osteoblastos [139]. Se ha sugerido al receptor sensible a calcio como mediador de al menos algunas de sus acciones en las células óseas [140].

La **PTH** es un polipéptido de 84 aminoácidos cuya secreción por las glándulas paratiroides está finamente regulada por las concentraciones de Ca^{2+} . Niveles crónicos de PTH endógena elevada (como ocurre en el hiperparatiroidismo) o su administración continuada promueven la resorción ósea; mientras que su administración intermitente ejerce acciones anabólicas en el hueso [141]. La

administración sistémica diaria de PTH es la única terapia anabólica aprobada en la osteoporosis que ha demostrado eficacia en la disminución de la incidencia de fracturas vertebrales y no vertebrales. La PTH (1-84) recombinante humana está disponible en Europa, mientras que su fragmento N-terminal 1-34 (*Teriparatide*) también se comercializa en EE.UU. El tratamiento indicado con ambos péptidos se encuentra limitado a 18-24 meses, debido a la teratogenicidad observada en estudios preclínicos en ciertas estirpes de rata [142]. Su administración intermitente induce un rápido incremento de los marcadores de formación ósea que, posteriormente, se acompaña de un aumento de marcadores de resorción ósea ("ventana anabólica"). En esta segunda fase, sin embargo, sigue predominando la actividad osteoformadora, que determina un balance óseo positivo. Este tipo de terapia con PTH se suele combinar con ciclos de tratamiento con un antiresortivo (generalmente, bifosfonatos), que ayuda a mantener la acción anabólica tras la interrupción de la terapia hormonal [143].

Otras terapias anabólicas basadas en inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina incluyen **anticuerpos neutralizantes de la esclerostina** o de **DKK-1** para promover la formación y la regeneración ósea. Actualmente, ambos anticuerpos se están evaluando en ensayos clínicos, comparando o combinando su efecto osteogénico con el de los bifosfonatos y la PTH. Especialmente, el anticuerpo monoclonal humanizado anti-esclerostina, de particular interés por la especificidad celular de este inhibidor, se presenta como agente pionero que no induce la resorción ósea en relación a otras terapias disponibles [72, 144, 145].

1.3.3. La PTHrP como agente anabólico potencial en la OP

La PTHrP se identificó inicialmente como el principal factor patogénico responsable de la hipercalcemia tumoral de origen humoral. Sin embargo, posteriormente se demostró su expresión en la mayoría de los tejidos normales, donde ejerce acciones múltiples tanto durante el desarrollo como en el adulto [146]. En el tejido óseo, la PTHrP juega un papel fundamental en el desarrollo del hueso endocondral, retrasando la diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento y actuando como un importante regulador local del remodelado óseo en adultos. Ratones homocigotos *Pthrp*^{-/-} presentan una condrodisplasia letal perinatal; mientras que los animales heterocigotos *Pthrp*^{+/-} son viables pero tienen una reducción significativa de la masa ósea [147].

El aislamiento y secuenciación de la PTHrP permitió comprobar la similitud estructural de esta proteína con la PTH en los dominios aminoacídicos 1-13 y 29-34 de su extremo N-terminal. Esta homología parcial determina sus acciones endocrinas observadas en la hipercalcemia tumoral, similares a las de la PTH, la estimulación de

la resorción ósea y la reabsorción renal del calcio; a través de la interacción de la PTHrP con el PTH1R en los osteoblastos y en las células túbuloepiteliales renales, respectivamente [146, 148, 149]. Este receptor de 7 dominios transmembrana y acoplado a proteínas G es el único clonado para la PTHrP a día de hoy [150]. Sin embargo, la PTH y la PTHrP difieren completamente más allá de la región N-terminal; en el caso de la PTHrP, su región media y C-terminal es más larga que en la PTH y contiene distintos epítomos singulares, asociados a efectos auto/paracrinós e intracrinós en distintos tipos celulares [149]. El gen de la PTHrP humana, localizado en el brazo corto del cromosoma 12, contiene 9 exones y presenta al menos 3 promotores y un silenciador en la región 5' (Fig. 6, superior). Por procesamiento alternativo en su extremo 3' se generan tres tipos distintos de ARNm, que dan lugar a tres isoformas proteicas de 139, 141 y 173 aminoácidos, respectivamente, en humanos [146, 151]. Cada una de estas isoformas codifica una secuencia N-terminal común que contiene la región homóloga con la PTH. Del aminoácido 35 al 111, la secuencia de la PTHrP está muy conservada en las distintas especies (en humanos solo difiere en dos aminoácidos respecto a la de roedores).

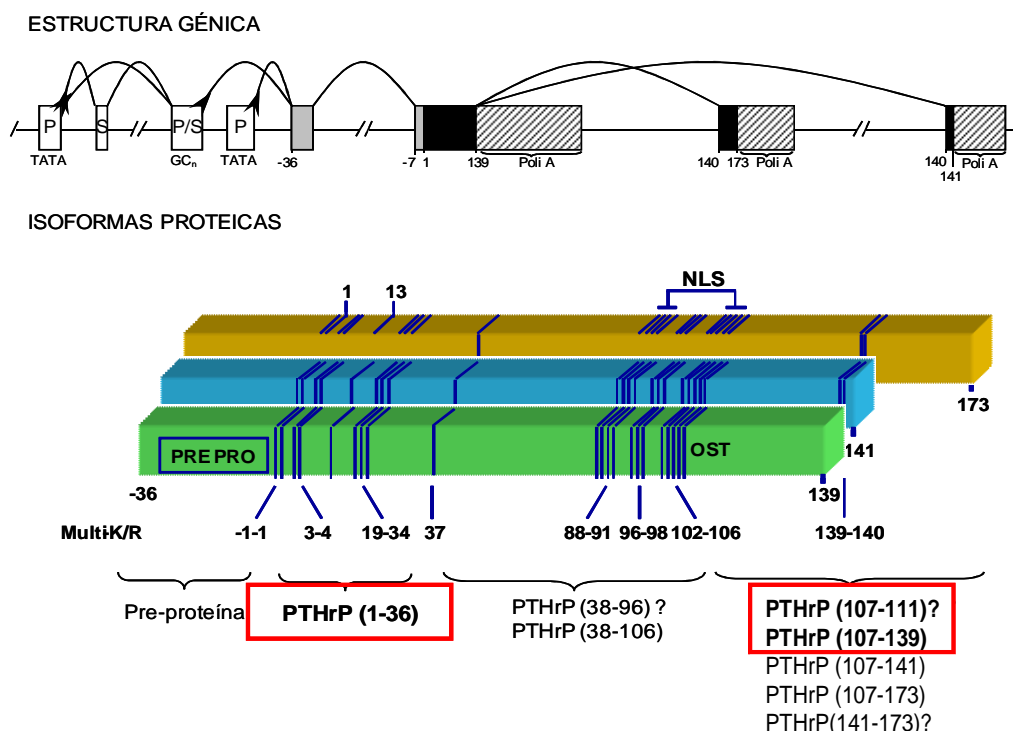


Fig.6. Esquema del gen de la PTHrP humana y su procesamiento post-traduccional. El gen de la PTHrP contiene 9 exones, de los cuales 4 no son traducidos, 3 promotores (P) y dos silenciadores (S). El procesamiento alternativo del gen da lugar a tres isoformas proteicas de 139, 141 ó 173 aminoácidos. Su procesamiento post-traduccional puede generar tres tipos de fragmentos, el N-terminal (1-36), homólogo a la PTH; la zona media (38-106), con secuencias de localización nuclear (NLS), que podría comprender sólo hasta el aminoácido 96 por proteólisis a través de endopeptidasas (E); y el C-terminal, que contiene la región de 5 aminoácidos 107-111, *osteostatina* (OST).

Como consecuencia de su procesamiento post-trasduccional [152], la PTHrP puede generar distintos fragmentos bioactivos: 1) un fragmento N-terminal 1-36; 2) uno o varios fragmentos en la región media, cuyos aminoácidos 88-91 y 102-106 son dominios de localización nuclear/nucleolar (NLS); y 3) un fragmento C-terminal a partir del aminoácido 107; la secuencia 107-111 se conoce como “osteostatina” (Ost) (Fig. 6, inferior).

La activación del PTH1R por el fragmento N-terminal de la PTH o la PTHrP induce la señalización a través de proteínas G: la proteína $G\alpha_s$ activa la vía adenilato ciclasa (AC)/proteína quinasa A (PKA), y la proteína $G\alpha_q$ acoplada a la vía de fosfolipasa C (PLC)/PKC. La primera predomina a concentraciones fisiológicas (sub-nM) de ligando, mientras que la vía PLC/PKC se activa a elevadas concentraciones (μ M) del mismo o cuando la densidad de receptores es alta [148]. Ambas vías de señalización convergen en la regulación de MAPKs, que se activan en los osteoblastos en fase de proliferación y se inhiben en los ya diferenciados [153]. Datos recientes demuestran diferencias en la cinética de interacción de la PTH y la PTHrP con el PTH1R, de manera que la señal de respuesta al AMPc se mantiene durante más tiempo tras la endocitosis del PTH1R inducida por la PTH en comparación con la PTHrP [154-157]. Este hecho podría tener consecuencias en ciertos aspectos diferenciados de su acción anabólica ósea.

La región media de la PTHrP, comprendida entre los aminoácidos 38 y 106, posee los dominios NLS responsables de sus acciones intracrinas [158, 159]. El dominio C-terminal de la PTHrP contiene los posibles fragmentos 107-111 y 107-139, que actúan como potentes inhibidores de la actividad osteoclástica [160]. Sin embargo, estudios más recientes avalan su potencial anabólico por acciones directas en los osteoblastos [161-163]. Aunque aún no se ha logrado aislar un receptor para esta región C-terminal de la PTHrP, se ha demostrado su señalización en la membrana a través de canales de Ca^{2+} y la transactivación del receptor 2 del VEGF (VEGFR-2) asociada a sus acciones en los osteoblastos [164-167].

1.3.3.1. Papel de la PTHrP en la proliferación, diferenciación y supervivencia osteoblástica

Estudios *in vitro* han demostrado que el fragmento N-terminal de la PTH o la PTHrP incrementa la proliferación de células osteoblásticas a baja densidad, mientras que su efecto sobre cultivos de osteoblastos a alta densidad resulta inhibitorio [168]. Este efecto dual se asocia a cambios inducidos en la expresión de inhibidores del ciclo celular [148, 168].

En cuanto a su papel en la diferenciación, existe una mayor expresión de PTHrP en los osteoblastos menos diferenciados que en los maduros [169]. Además, en estas células, tanto la PTH como la PTHrP incrementan la expresión génica y proteica de marcadores de diferenciación como Runx2, FA y OC [162, 170, 171]; un efecto mediado por la activación de diferentes vías de señalización, que incluyen PKA, PKC, PI3K y MAPK [172]. Por otro lado, ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP poseen acción anti-adipogénica en la médula ósea de ratones osteoporóticos [170, 173].

La supervivencia osteoblástica al final del ciclo de remodelado óseo es el factor clave que determina el número de osteoblastos. Estudios en modelos animales revelan que en la osteoporosis existe un aumento de osteoblastos apoptóticos en el hueso trabecular [24]. De hecho, en ratones osteopénicos por mutaciones en el gen de la PTHrP se ha observado un aumento de apoptosis osteoblástica [174, 175]. Así, en este contexto, la administración intermitente de PTH o PTHrP previene la apoptosis de osteoblastos y osteocitos asociada al tratamiento con GCs o a la DM1 [173, 176, 177]. Estudios *in vitro* sugieren que este efecto de la PTHrP sobre la supervivencia osteoblástica se manifiesta sobre todo en los osteoblastos menos diferenciados; mientras que este factor promovería la apoptosis de osteoblastos maduros para favorecer la formación de hueso nuevo en la BRU [178]. De cualquier modo, la acción anti-apoptótica de la PTH y PTHrP en los osteoblastos depende de la producción de AMPc y la consecuente activación de la PKA, que fosforila al elemento de unión en respuesta a AMPc, estimulando la transcripción de genes antiapoptóticos (como Bcl-2) [165, 179].

1.3.3.2. La PTHrP y su relación con la DM

La DM, sobretudo la DM1, se caracteriza por un bajo remodelado óseo junto a una deficiencia en la expresión de *Pth1r*. Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que la PTHrP revierte los efectos deletéreos de la DM1 (inducida por la estreptozotocina -STZ-) sobre el número de células osteoformadoras y la función osteoblástica en un modelo murino de regeneración en la tibia [170]. De acuerdo con estas observaciones *in vivo*, la PTHrP (1–36) es capaz de compensar la disminución de diferenciación osteoblástica inducida por la alta glucosa; mientras que la neutralización de sus niveles endógenos o sus acciones a través del PTH1R mimetizan el efecto de esta situación “diabética” *in vitro* [170]. Además, trabajos recientes en el mismo modelo murino de DM1 apoyan la acción anabólica del fragmento de la PTHrP (107-139) por acciones directas sobre los osteoblastos y los osteocitos [162, 176].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Considerando los aspectos reseñados anteriormente, en la presente Tesis hemos pretendido identificar algunos de los mecanismos implicados en la osteopenia diabética que pudieran constituir posibles dianas terapéuticas. Además, hemos hipotetizado que las acciones osteogénicas de la PTHrP en esta situación se ejercen: 1) a través de sus interacciones con la vía canónica de Wnt/ β -catenina; y 2) de manera independiente, al menos en parte, del IGF-I.

En concreto, se plantearon los siguientes objetivos:

- 4) En cultivos de células osteoblásticas, estudiar los efectos de la alta glucosa sobre la viabilidad y la diferenciación celular, así como en la activación de la vía Wnt/ β -catenina.
- 5) Determinar las interacciones de la PTHrP con la vía Wnt/ β -catenina en relación con su acción osteogénica en situación diabética in vitro e in vivo.
- 6) Caracterizar la capacidad osteogénica de la PTHrP en situación de deficiencia en IGF-I.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describen los distintos modelos celulares y de ratón (Apartados 3.1 y 3.2), así como las técnicas experimentales (Apartado 3.3) que se han utilizado en esta Tesis Doctoral.

3.1. Modelos experimentales *in vitro*

3.1.1. Células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1-subclon 4

Las células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 (subclon 4) (CRL-2593™; ATCC) [170]) fueron cultivadas en medio esencial mínimo α (α -MEM) suplementado con L-glutamina 2 mM, suero fetal bovino (SFB) al 10% y penicilina–estreptomicina al 1% en atmósfera de CO₂ al 5%, a 37°C. Las células se mantuvieron en condiciones de glucosa normal (NG, 5.5 mM) o alta glucosa (AG, 25 mM) (D-glucosa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), en presencia o ausencia de diferentes estímulos: medio condicionado por fibroblastos de ratón (células L) que sobreexpresan *Wnt3a* (CRL-2647™, ATCC) al 25% del volumen final en el pocillo [180, 181], LiCl (25 mM) y los péptidos de la PTHrP N-terminal (1-36) y C-terminal (107-139) (100 nM), durante 1 día o 5 días en medio de diferenciación osteoblástica (L-ascórbico 50 μ g/ml y β -glicerolfosfato 10 nM) (Fig.7). En algunos casos se utilizó L-glucosa (25 mM) (Sigma-Aldrich) como control osmótico y PTH (1-34) (Sigma-Aldrich) como control positivo. El medio de cultivo y los diferentes estímulos fueron reemplazados cada 48 horas con el fin de evitar cambios de pH que pudieran afectar al metabolismo celular. A los diferentes tiempos de estudio las células se tripsinizaron (Lonza, Verviers, Bélgica) y se sembraron de acuerdo a los requerimientos de cada uno de los estudios realizados: expresión proteica y génica, actividad transcripcional, estrés oxidativo e inmunocitoquímica (Fig.7).

3.1.1.1. Generación de células osteoblásticas MC3T3-E1 con inhibición de autofagia

Las células MC3T3-E1 fueron infectadas con partículas lentivirales que contenían un vector portador (pLKO.1) de una secuencia de ARN no codificante (*scrambled*) o una secuencia de silenciamiento de ARN de horquilla corta contra *Atg7* (Mission® shRNA TRCN0000092163, Sigma-Aldrich). Cada vector incorporaba además una secuencia de puomicina (Sigma) para la selección de los clones. Las secuencias sentido y antisentido incluídas en los vectores se muestran en la Tabla II.

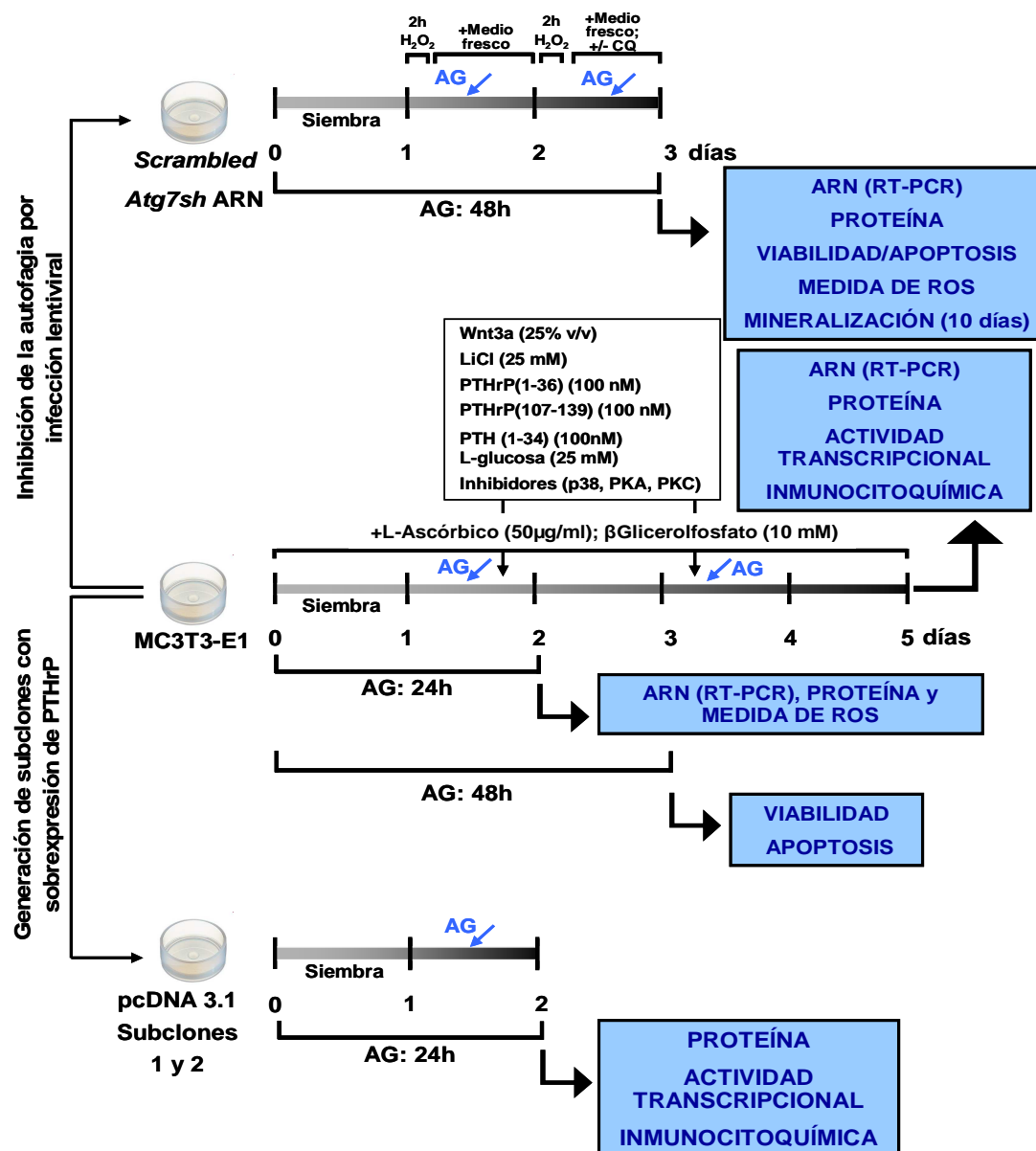


Fig.7. Esquema experimental utilizado con los distintos clones de las células MC3T3-E1: nativas, con la autofagia inhibida y con sobreexpresión de PTHrP. AG, alta glucosa.

Tabla II. Secuencias oligonucleotídicas sentido y antisentido utilizadas para el silenciamiento del gen *Atg7*. Se muestra en minúscula la secuencia específica que codifica para el shARN de interés.

Secuencia	Sentido 5'-3'	Antisentido 5'-3'
Scrambled	CCGGcctaaggttaagtcgccctcgCT CGAGcgagggcgacttaacctaggTT TTTG	AATTCAAAAacctaaggttaagtcgccctc gCTCGAGcgagggcgacttaacctagg
shARN <i>Atg7</i>	CCGGccagctctgaactcaataaCT CGAGtattattgagtcagagctggTTT TTG	AATTCAAAAaccagctctgaactcaataat aCTCGAGtattattgagtcagagctgg

3.1.2. Cultivo primario de osteoblastos de calota de ratón (mOBs)

Se utilizaron cultivos primarios obtenidos a partir de calotas de embriones de ratón (E18.5) mediante digestión secuencial con collagenasa y dispasa [182]. Estas células se mantuvieron en el medio de diferenciación osteoblástica citado anteriormente durante dos semanas previamente a su exposición a AG, en presencia o ausencia de diferentes agonistas durante 24 h. En estas células se realizaron estudios de expresión génica y proteica (Fig.9).

3.1.3. Células C3H10T1/2

Las células mesenquimales multipotentes de ratón C3H10T1/2 (subclon 8) (CCL-226™; ATCC, Mannassas, VA, EEUU) se mantuvieron en medio basal de Eagle con L-glutamina 2 mM, SFB al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%, a 37°C, en medio de diferenciación osteoblástica. Estas células se incubaron en presencia o ausencia de AG, con medio condicionado conteniendo WNT3a al 25% o los péptidos de la PTHrP, para evaluar cambios en la expresión génica y proteica (5 días) y en la actividad de FA (3 días) (Fig.9)

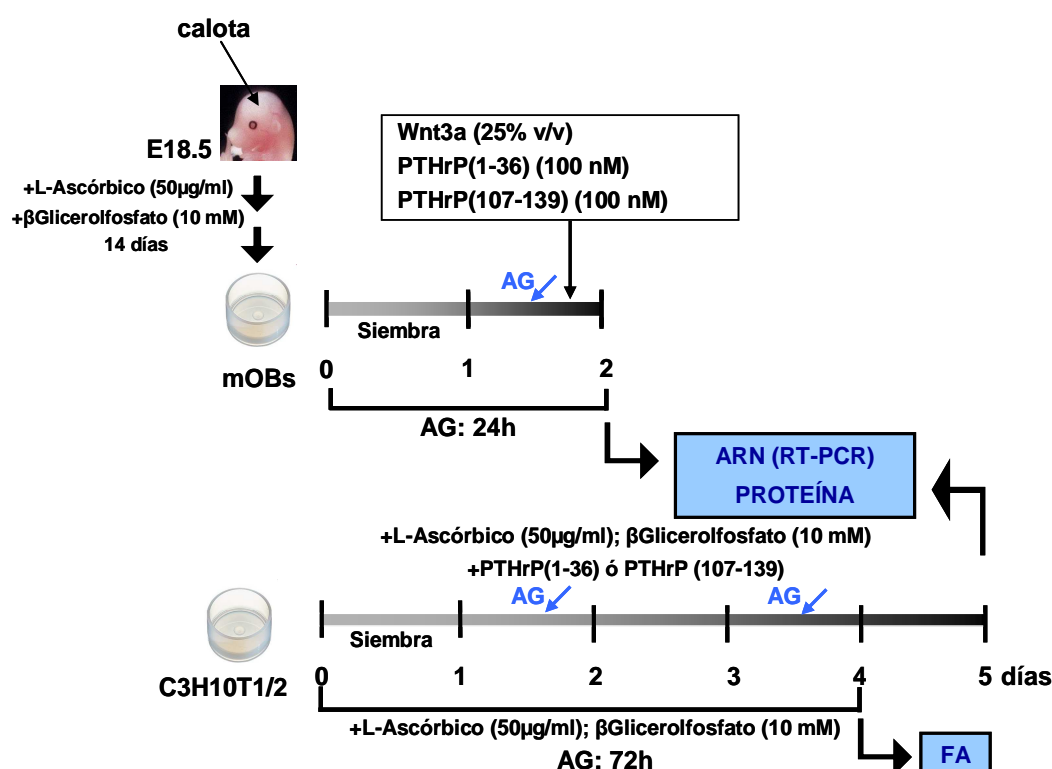


Fig.9. Esquema experimental utilizando células osteoblásticas derivadas de calotas de embriones de ratón (mOBs) y mesenquimales de ratón C3H10T1/2. AG, alta glucosa.

3.2. Modelos experimentales in vivo

Todos los estudios realizados en animales en esta Tesis Doctoral fueron desarrollados con la aprobación del Comité de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria (IIS)-Fundación Jiménez Díaz (FJD). El dolor y el sufrimiento de los animales fueron paliados de acuerdo a la normativa europea vigente [183]. Igualmente, nos adaptamos en el diseño experimental al criterio conocido como las 3R (del inglés, *replace*, *reduce*, *refine*) para minimizar el número de animales que permitan obtener resultados significativos [184].

3.2.1. Modelo de ratón con DM1

Los ratones CD-1 macho de 4 meses de edad (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, España) se estabilizaron durante un periodo de cuarentena de dos semanas en el animalario del IIS-FJD. Los animales tuvieron acceso libre a agua y a una dieta estándar (8,8 g/Kg de calcio y 5,9 g/Kg de fósforo; Panlab, Reus, España) en una habitación mantenida a 22 °C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Para inducir la DM, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con STZ (Sigma), una citotoxina que destruye las células β pancreáticas, durante 5 días consecutivos a una dosis de 45 mg/Kg de peso corporal en tampón citrato sódico 50 mM, pH 4,5, o con vehículo (controles). Una semana después de la última inyección se midió la glucosa en sangre, extraída de la cola del ratón, mediante un glucómetro (Glucocard G+-meter, A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia); considerándose diabéticos aquellos ratones con niveles de glucemia ≥ 250 mg/dl. Dos semanas después de la confirmación de la DM, algunos ratones diabéticos se trataron con 100 μ g/Kg de PTHrP (1-36) (Nt) o de PTHrP (107-139) (Ct) (Bachem, Bubendorf, Suiza), o con tampón KCl 50 mM, pH 4,5 cada dos días por inyección subcutánea, durante un total de 14 días (Fig.10). Se utilizaron 5 ratones/grupo en estos 4 grupos experimentales: control (tratado con salino; Co), diabético (DM), diabético tratado con PTHrP (1-36) (DM+Nt) y diabético tratado con PTHrP (107-139) (DM+Ct). Dos horas después de la última inyección de los tratamientos, los animales se pesaron y posteriormente fueron sacrificados con una mezcla de ketamina (Pfizer, Madrid, España) 20 mg/Kg y xilacina (Bayer, Kiel, Alemania) 10 mg/Kg (2:1, v/v).

Mediante absorciometría dual de rayos X (DEXA) se midieron la DMO, la cantidad mineral ósea (CMO) y el % de grasa periósea una vez realizado el sacrificio. Posteriormente, se extrajeron los fémures, las tibias (descartando el peroné) y la columna vertebral (vértebras lumbares L1-L5), eliminando los restos de músculo adyacentes. Los huesos largos se destinaron a la obtención de cultivos de células

mesenquimales de médula ósea (CMMOs) o fueron almacenados para la posterior extracción de ARN (en N₂ líquido) o el análisis de proteínas carboniladas (-80°C). La columna vertebral se almacenó a -20°C hasta su inclusión en bloques de metacrilato y posterior análisis de histomorfometría ósea. El esquema de la procedencia y posterior utilización de cada pieza ósea de estos ratones se resume en la (Fig.10).

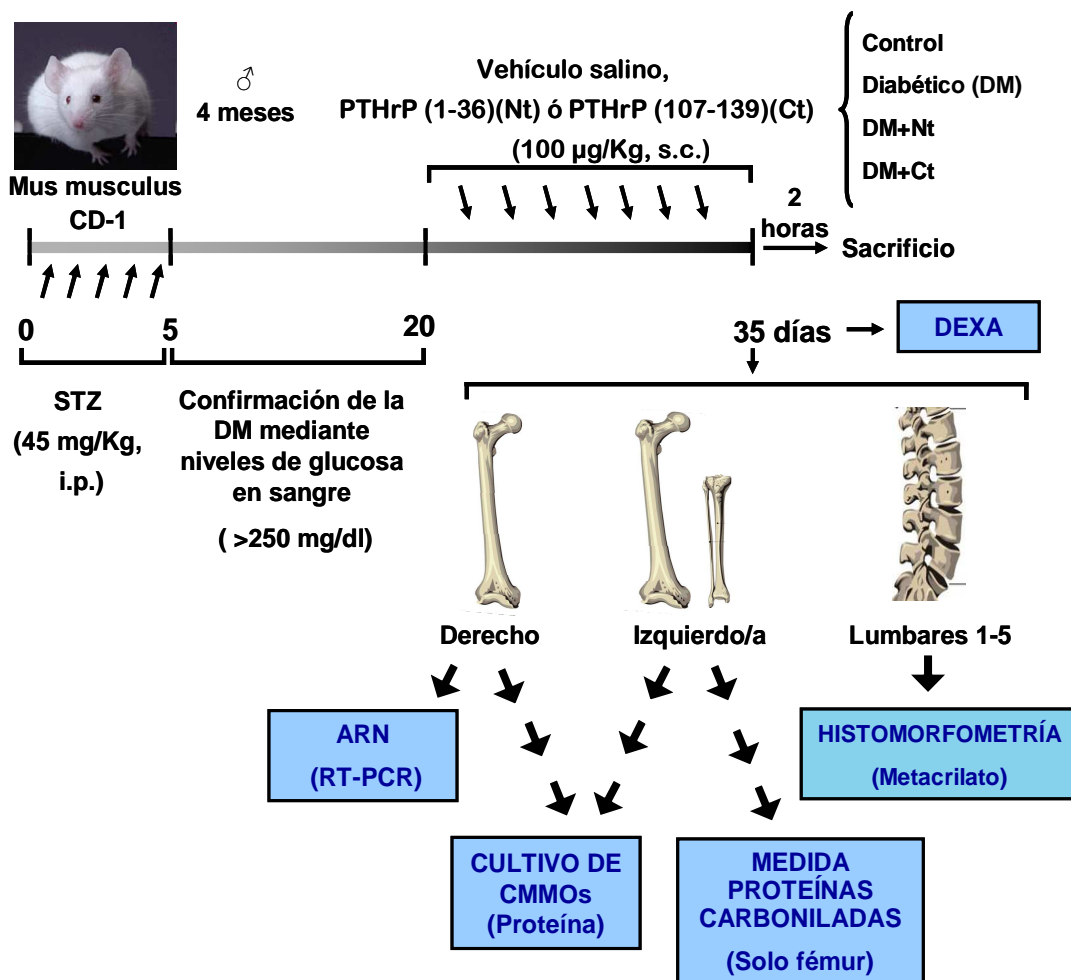


Fig.10. Esquema experimental del modelo murino de DM1. Descripción esquemática de la inducción de DM por inyecciones de STZ y de los tratamientos con los péptidos de la PTHrP. Se muestran las determinaciones en las distintas muestras óseas de estos animales al final del estudio.

3.2.2. Modelo de ratón deficiente en IGF-I

Se utilizaron ratones control o con deficiencia heterocigótica u homocigótica en IGF-I de 3 meses de edad. Los ratones *Igf1*-nulos, con un fondo genético mixto MF1/129sv, se generaron tras el cruce de ratones heterocigotos con una delección en el exón 4 del gen *Igf1*. Dicha delección se produjo al realizar el reemplazo de una secuencia del exón 4 por un *cassette* de neomicina, según se ha descrito previamente

[126]. Los ratones fueron genotipados mediante *Southern Blot* tras la extracción de ADN genómico proveniente de la cola con REDExtract-N-AmpTMTissue PCR Kit (Sigma-Aldrich) [185]. Previamente a nuestro estudio, ratones homocigotos nulos para *Igf1*, heterocigotos deficientes en este factor y sus controles fueron caracterizados con criterios funcionales (p.e., la respuesta auditiva cerebral) para ratificar las alteraciones fenotípicas previamente publicadas [186]. Los ratones heterocigotos no mostraron diferencias significativas respecto al umbral de detección de sonido registrado en ratones control; mientras que los ratones deficientes en *Igf1* (*Igf1*-nulos) presentaron un umbral que superaba en más de 3 veces al registrado en los controles. Los ratones heterocigotos no mostraron alteraciones significativas ni en el peso ni en los niveles circulantes de IGF-I (medido con ELISA OCTEIA Rat/Mouse IGF-I kit; IDS, Boldon, RU). En los ratones *Igf1*-nulos estos niveles son prácticamente indetectables. Así pues, los ratones heterocigotos fueron excluidos del estudio planteado en la presente Tesis.

De este modo, se establecieron 3 grupos experimentales con 6 ratones/grupo para cada uno de los genotipos utilizados (control e *Igf1*-nulos): tratados con PTHrP (1-36), PTHrP (107-111) o con tampón salino fosfatado (TSF). Al comienzo del estudio y antes de la administración de los tratamientos (día 0), cada ratón se pesó y se sometió a DEXA. Posteriormente, se administraron a los ratones los péptidos de la PTHrP (80 µg/Kg) o el vehículo salino por inyección subcutánea cada 48 horas durante dos semanas. Se eligió esta dosis debido a que dosis similares de PTHrP (1-36) y PTHrP (107-111) inducen efectos anabólicos o anti-resortivos, respectivamente, en roedores [170, 173]. Al día 14, los ratones fueron de nuevo pesados y densitometrados. A las 2 h de la última inyección se sacrificaron, obteniéndose ambos fémures y tibias, que se almacenaron para la posterior extracción de ARN (N₂ líquido) y de proteína total o realización de microtomografía computerizada (µCT) e histología (-80°C). Otro grupo de ratones, control (2 ratones) e *Igf1*-nulos (5 ratones) fueron sacrificados para la obtención de CMMOs provenientes de los huesos largos. El esquema de la procedencia y posterior utilización de cada una de estas muestras óseas se resume en la (Fig.11).

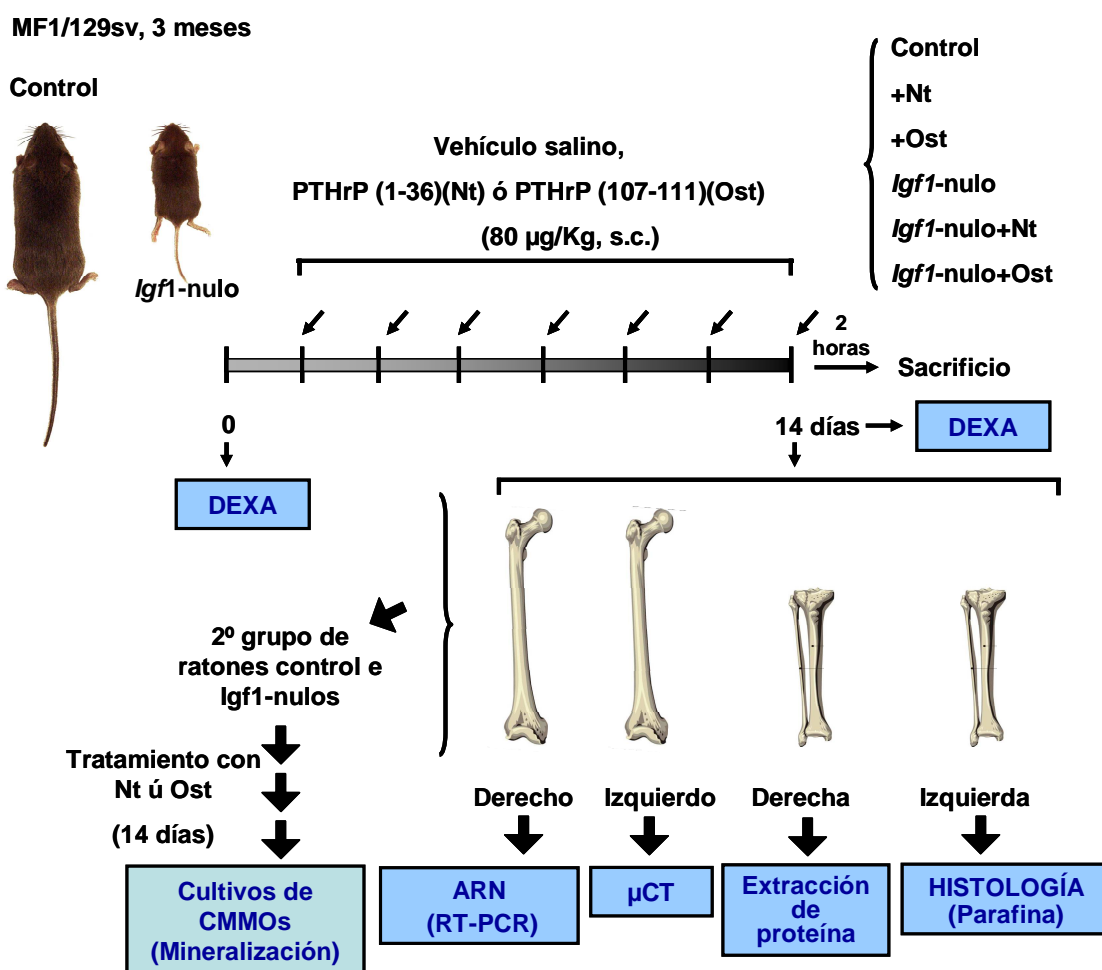


Fig.11. Esquema experimental del modelo murino deficiente en IGF-I. Descripción esquemática de la administración de los péptidos de la PTHrP (o vehículo salino) y de las determinaciones en las muestras óseas al final del estudio.

3.2.3. Cultivo de CMMOs ex vivo

Para la obtención de las CMMOs de los fémures y tibias obtenidos en ambos modelos animales, se perforaron las epífisis de manera paralela a la diáfisis con una aguja quirúrgica de tipo 20G de grosor. La cavidad medular se perfundió con medio de cultivo α -MEM suplementado con SFB al 15%, penicilina–estreptomicina al 1% y fungizona 2,5 µg/ml, obteniéndose la médula ósea. Tras varios lavados se obtuvo una suspensión homogénea que se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 min en frío. El precipitado celular se resuspendió en el medio mencionado anteriormente (sin fungizona), contando el número de células viables (por exclusión de azul de tripán) en un contador de células automático (*Countess*TM, Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Posteriormente, las células se sembraron a una densidad de $1-2,5 \times 10^6/\text{cm}^2$ en placas de 6 o 12 pocillos en una atmósfera húmeda de CO_2 al 5% a 37°C [173]. Se añadió medio de diferenciación osteogénica al cultivo el tercer día de la siembra. Las

células se mantuvieron bajo estas condiciones durante 14 días siendo la mitad del volumen del medio condicionado reemplazado cada dos días. En el modelo de DM1 se cultivó la médula ósea de los ratones de cada grupo experimental, incluyendo los tratados *in vivo* con los péptidos de la PTHrP; mientras que en el caso del modelo deficiente de *Igf1* las CMMOs procedentes de ratones control e *Igf1*-nulos se trataron *in vitro* con los péptidos de la PTHrP. Los péptidos de la PTHrP se añadieron en el momento del cambio de medio. El diseño experimental se muestra en la Fig.12.

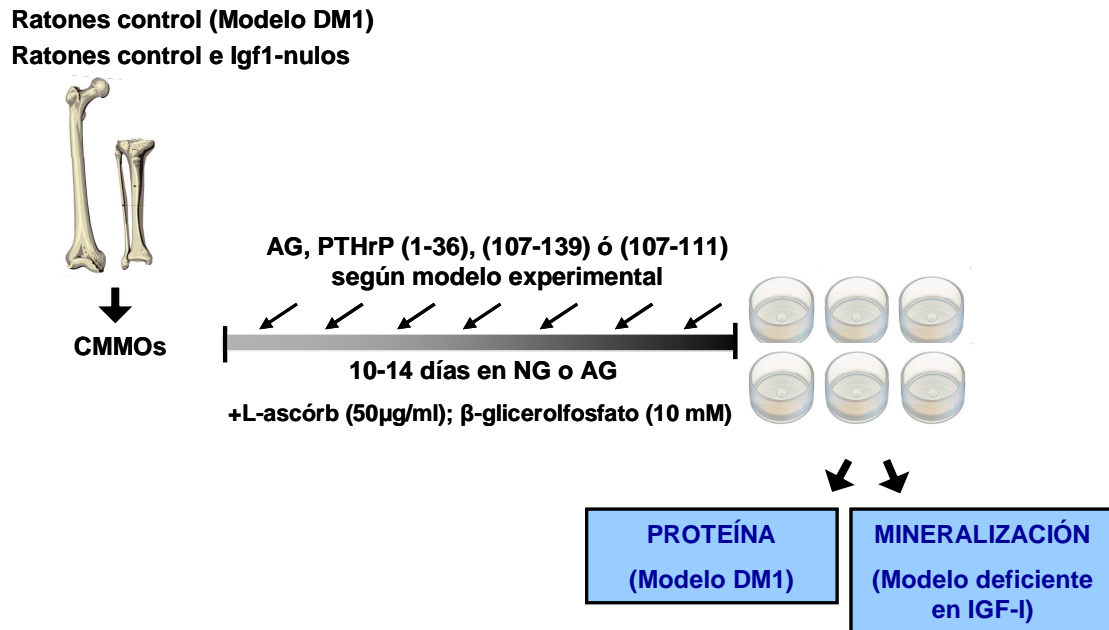


Fig.12. Esquema de tratamiento de las CMMOs provenientes de los huesos largos de ambos modelos experimentales utilizados en esta Tesis Doctoral. NG, normoglucosa; AG, alta glucosa.

3.3. Técnicas experimentales

3.3.1. Ensayos de viabilidad celular y apoptosis

Las células osteoblásticas con o sin la autofagia inhibida fueron sembradas a una densidad de $2-5 \times 10^3$ células/cm² y mantenidas en medio α -MEM con SFB al 1% durante 48 h con los agonistas. A continuación, las células fueron tripsinizadas, determinándose el número de células que excluyen (vivas) o captan (muertas) el azul tripán en un contador automático de células. Para cuantificar la apoptosis, se llevó a cabo un marcaje con anexina V y yoduro de propidio utilizando el *Annexin V-FITC Apoptosis kit* (Immunostep, Salamanca, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. La anexina V marca los residuos de fosfatidilserina expuestos en la membrana de aquellas células en fase temprana de apoptosis, mientras que el yoduro de propidio se une al DNA en aquellas células necróticas cuya membrana está dañada

y es permeable [187]. Las evaluaciones fueron llevadas a cabo en el Centro de Asistencia a la Investigación de la UCM.

3.3.2. Medida de ROS

La generación intracelular de ROS se cuantificó mediante la conversión del compuesto 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). El DCFH-DA es deacetilado por esterasas en la membrana plasmática a DCFH (no fluorescente), que es oxidado a DCF (fluorescente) por ROS en el citoplasma [188]. Las células osteoblásticas se sembraron a una densidad de 2×10^3 células/cm² en placas de 6 pocillos y fueron expuestas o no a los diferentes estímulos durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con TSF e incubadas con 2,7-DCFH-DA 5 μ M durante 10 min, seguidos de una incubación de 5 min sin el fluorocromo a temperatura ambiente. Acto seguido, se tripsinizaron y centrifugaron a 2.000 rpm, recogiendo el precipitado celular que tras varios lavados se resuspendió en TSF. El incremento de fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo (FACscalibur; BSBioscience, San José, CA).

3.3.3. Transferencia *western* (Inmunotransferencia)

Para extraer proteína del tejido óseo, se procedió a la homogenización mecánica del mismo en un mortero; mientras que para la extracción proteica de líneas celulares, se sembraron a una densidad de $1-2 \times 10^4$ células/cm² en placas Petri de 60 cm². En ambos casos se empleó tampón RIPA [Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%, deoxicolato sódico al 1% y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1%], suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail* P8340, Sigma-Aldrich) y de fosfatasa (*Phosphatase inhibitor cocktail Set II*, Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.). Tras la incubación de las muestras con esta solución durante 30 min a 4°C, se centrifugaron a 13.000 rpm durante otros 30 min, recogiendo los sobrenadantes. Las proteínas de la fracción citosólica fueron extraídas con el *Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La medida de la concentración de proteína se realizó con un método estándar que utiliza ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Fisher Scientific), y una curva patrón de seroalbúmina bovina (SAB).

Los extractos proteicos (5-20 μ g) fueron separados en geles de poliacrilamida-SDS al 8-12% con beta-mercaptoetanol al 5% [189]. A continuación, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot® SD *semi-dry transfer cell*, Bio-Rad, CA, EE.UU.). Seguidamente, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 2,5% en un tampón Tris-salino (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 al

0,1%). Los anticuerpos primarios y secundarios empleados, así como las condiciones de incubación en cada caso, se describen en la Tabla III.

Tabla III. Relación de anticuerpos utilizados y condiciones de su utilización en inmunotransferencia.

Antígeno	Anticuerpo primario	Incubación	Anticuerpo secundario	Incubación
LC3B	Policlonal de conejo (Cell Signaling, Danvers, MA, EEUU) [1:1000]	T/N, 4°C	IgG de oveja anti-conejo-HRP (GE Healthcare) [1:5000]	1h, T/A
ATG7			IgG de cabra anti-conejo-HRP (Santa Cruz) [1:300]	
p-Ser9-GSK3β	Monoclonal de ratón (Cell Signaling) [1:300]		IgG de cabra anti-ratón-HRP (Santa Cruz) [1:300]	
GSK3β	Policlonal de conejo (Abcam, Cambridge, Reino Unido) [1:10000]		IgG de cabra anti-conejo-HRP (Santa Cruz) [1:10000]	
β-catenina	Monoclonal de ratón (Cell Signaling) [1:500]		IgG de cabra anti-ratón-HRP (Santa Cruz) [1:1000]	
HA	Policlonal de cabra; (R&D systems, Minneapolis, MN, EEUU) [0,2 µg/ml]	48 horas, 4°C	IgG de burro anti-cabra-HRP (Santa Cruz) [1:2000]	
Esclerostina	Monoclonal de ratón (Sigma) [1:10.000]	T/N, 4°C	IgG de cabra anti-ratón-HRP (Santa Cruz) [1:10000]	
α-tubulina	Monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) [1:500]		IgG de cabra anti-ratón-HRP (Santa Cruz) [1:1000]	
β-actina	Policlonal de conejo (Cell Signaling) [1:1000]		IgG de cabra anti-conejo-HRP (Biorad) [1:3000]	
p-p44/42 Erk1/2 (Thr202/Tyr204)				
p44/42 MAPK (Erk 1/2)				
p-Ser473-Akt				
p38 MAPK				

T/N: toda la noche; T/A: temperatura ambiente; HRP: peroxidasa de rábano.

Tras la incubación de las membranas con los correspondientes anticuerpos secundarios combinados con peroxidasa, las bandas inmunorreactivas fueron reveladas con *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare, Buckinghamshire, R.U.) o con *Supersignal West Dura* (Thermo Fisher Scientific) y analizadas mediante el programa informático de densitometrado *Image J* v1.46r (National Institutes of Health, EE.UU.).

Una alícuota de las proteínas extraídas del fémur de los ratones del modelo de DM1 se utilizó para la cuantificación de proteínas carboniladas. Los grupos carbonilo, un marcador de estrés oxidativo [190], en estas proteínas fueron derivatizados con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP-hidrazina) mediante *OxyBlot protein oxidation detection kit* (Millipore, Billerica, MA, EEUU) para la obtención de proteína DNP-hidrazona estable que, posteriormente, es detectada por inmunotransferencia. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5 % que fueron cargados con 20 µg de los extractos proteicos. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinidileno (Schelider & Schuel, Keene, NH, EEUU), seguido de incubación con un anticuerpo primario policlonal anti-DNP y con un secundario conjugado con HRP. Las bandas resultantes se visualizaron por quimioluminiscencia.

3.3.4. Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

Para la extracción del ARN total del hueso se procedió a su homogenización en un mortero; mientras que para su extracción de líneas celulares, las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^3 - 2×10^4 células/cm² en placas de 6 pocillos. En ambos casos, se utilizó un método estándar con Trizol (Invitrogen, Groningen, Holanda) a 4°C. La retrotranscripción del ARN obtenido a ADNc se llevó a cabo a partir de 0,5 -1,5 µg de ARN con el *cDNA High capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) en un termociclador Techne Techgene (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, R.U.), siguiendo el siguiente protocolo secuencial: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C, 5 min a 85°C.

La PCR a tiempo real se realizó con: 1) cebadores específicos de ratón para los siguientes genes: *Atg7*, *Wnt3a*, *Fz2*, *Lrp5* y *Lrp6* (secuencias descritas en la Tabla IV), y la mezcla de reacción *SYBR Premix Ex-Taq green* polimerasa (Takara, Otsu, Japón); 2) sondas *TaqMan MGB* (Assay-by-Design™ System, Applied Biosystems) para los genes: *Runx2*, *Osx*, *Oc*, *Opg*, *RANKL*, *Dkk1*, *Ccnd1*, *Axina 2*, *Lef1*, *Cx43*, catalasa, gen de arresto del crecimiento y daño al ADN 45 (*Gadd45*), *Pthrp*, *Pth1r*,

Igf1, *Igf1r*, *Igf2* e *Irs2*, y una mezcla de reacción con *Premix Ex-Taq* polimerasa (Takara) en un termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). En paralelo, se amplificó el ARN 18s ribosomal como gen de referencia normalizador.

Tabla IV. Secuencias de los cebadores específicos empleados para la amplificación génica por PCR a tiempo real.

Cebador	Secuencia Sentido 5'-3'	Secuencia Anti-sentido 5'-3'
<i>Atg7</i>	TTCAGTGCTTTTGACATGAGTGC	CACCTGACTTTATGGCTTCCC
<i>Wnt3a</i>	GCACCACCGTCAGCAACAG	GGGTGGCTTTGTCCAGAACA
<i>Fzz2</i>	CCGTCTCTGGATCCTCACAT	AGAAGCGCTCATTGCATACC
<i>Lrp5</i>	CAACGTGGACGTGTTTTATTCTTC	CAGCGACTGGTGCTGTAGTCA
<i>Lrp6</i>	AGATCCATCAAGTGGGTTTCATGTA	GAAGCGACTTGAGCCATCCA
18s	ATGCTCTTAGCTGAGGTGCCCG	ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG

En el caso 1), tras una incubación inicial de 2 min a 95° C, se procedió a efectuar 40 ciclos de: 15 s a 95° C, 30 s a 60° C y 35 s a 72° C; mientras que en el caso 2), tras una incubación inicial de 2 min a 50° C y 10 min a 95° C, las muestras se sometieron a 46 ciclos de 15 seg a 95° C y 1 min a 60° C. Las curvas de disociación fueron empleadas como control y verificación de la obtención de un único producto de amplificación. Los resultados se expresaron como niveles de expresión génica en cada condición experimental, respecto al control correspondiente: $2^{-\Delta Ct}$; donde Ct representa el ciclo umbral de PCR en el cual el programa detecta por primera vez un incremento de la fluorescencia sobre la señal basal; $\Delta Ct = Ct \text{ (gen de interés)} - Ct \text{ (control endógeno, 18s)}$ [191]. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.3.5. Ensayo de la actividad de FA y mineralización

Las células osteoblásticas o mesenquimales fueron mantenidas en medio de diferenciación durante 72 h (experimentos de actividad de FA) o 10-14 días (experimentos de mineralización). La actividad de FA se analizó en extractos de proteína celular extraídos con Tritón X-100 al 1% utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato (Sigma) en un tampón de dietanolamina 1 M, MgCl₂ 0,5 M, pH 9,8 [173]. La hidrólisis de este sustrato a pH alcalino genera p-nitrofenol, cuya absorbancia a 405

nm se cuantifica. Se definió como unidad de actividad enzimática los nmoles de p-nitrofenol/minuto, normalizada con el contenido de proteína total, determinada como se ha indicado anteriormente.

Para determinar la mineralización, las células se fijaron con Merckofix (Merck) a temperatura ambiente durante 10 min y después se tiñeron con rojo de alizarina S 40 mM (Merck), pH 4,2, durante 30 min. Tras varios lavados, se eluyó el colorante con cetilpiridinio (Sigma-Aldrich) al 10% (p/v) en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7, recogiendo los eluidos en los que se midió su absorbancia a 620 nm.

3.3.6. Inmunocitoquímica de β -catenina

Las células osteoblásticas se sembraron a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/cm² sobre cubreobjetos previamente esterilizados con luz ultravioleta. Una vez adheridas, las células se trataron con los agonistas durante 24 h. Posteriormente, las células fueron fijadas con Merckofix (Merck) y permeabilizadas con Tritón-X 100 al 0,1% durante 10 min. Tras el bloqueo con SAB al 5% durante 30 min, se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti- β -catenina (ver Tabla III), a una dilución 1:200, durante 1 h. Tras lavados con TSF con Tween20 al 0.05% (TSFT), se añadió una IgG anti-conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich), a una dilución de 1:200, durante 1 h, protegiendo de la luz la preparación. Tras sucesivos lavados con TSFT, las células se incubaron con una mezcla de yoduro de propidio y ARNasa H (1:10) (Sigma) para la eliminación del ARN del citoplasma que pudiera interferir en la señal fluorescente. La ausencia de anticuerpo primario se utilizó como control negativo. Las muestras se montaron sobre portaobjetos utilizando Mowiol 4-88 (Calbiochem) para su examen en un microscopio confocal Leica DM-IRB (JH Technologies, Fremont, CA, EEUU).

3.3.7. Ensayos de la actividad transcripcional de β -catenina y de FoxO

Para el ensayo de actividad transcripcional de β -catenina, las células fueron sembradas a una densidad de 2×10^3 células/cm² en placas de 12 pocillos. Los plásmidos empleados para llevar a cabo estas determinaciones (Fig.13) fueron amplificados utilizando un sistema *maxiprep* (*Endofree® Plasmid Maxi Kit*, Quiagen, Venlo, Holanda). Las células fueron co-transfectadas en ausencia de SFB durante toda la noche, utilizando el agente transfectante *X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent*, como se ha descrito anteriormente (ver apartado 3.1.1.2.). La cantidad de plásmido transfectado fue: 1 μ g para *TOPflash*-TCF, *pcDNA3.1* y *pCL-neo*- β -catenina S33Y; y 5 ng para *pRL-TK*-Renila (Fig.13). Finalizado el tiempo de transfección, las

células se expusieron a los diferentes estímulos durante 24 h. Los inhibidores se añadieron 2 horas previas a la adición de los agonistas en su caso.

Para evaluar la actividad transcripcional de FoxO, las células fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 células/cm² en placas de 6 pocillos y se transfectaron durante toda la noche con 1 µg del plásmido *pGL3-FoxO-luc* y 10 ng de *pRL-TK-Renila* (Fig.13), de modo similar a como se describe en el párrafo anterior. Transcurrido el tiempo de transfección, las células se incubaron con los diferentes estímulos 24 h.

Finalmente, las células fueron homogenizadas con tampón de lisis (Promega) y la actividad luciferasa/renila se determinó con el *Dual Luciferase Kit* (Promega) en un luminómetro (Berthold FB/12 Sirius; Pforzheim, Alemania). Los valores de actividad de la renila se utilizaron como normalizadores de los de la actividad luciferasa [181].

3.3.8. DEXA

La DMO (g/cm²), CMO (g) y el contenido graso perióseo se analizaron utilizando un equipo PIXImus I (GE Lunar Corp., Madison, WI, EE.UU.). El programa de este equipo calcula los parámetros citados en diferentes regiones del esqueleto (excluyendo la cabeza) con un coeficiente de variación de $\pm 2\%$. Elegimos como regiones de interés en los ratones el cuerpo total, el fémur, la tibia y la columna lumbar (vértebras L1-L5).

3.3.9. Histomorfometría ósea

La técnica de inclusión de las muestras óseas en una resina de metilmetacrilato polimerizado permite estudiar el hueso sin descalcificar preservando sus características histológicas. Las muestras de vértebras L1-L5 se fijaron durante 24 h en etanol al 70%, y posteriormente se deshidrataron en etanol 96% durante dos días y etanol absoluto otros dos días. A continuación, cada muestra fue impregnada en una mezcla de metil-metacrilato (Merck, Whitehouse Station, NJ, EEUU) con dibutilftalato (plastificante) (50:1, v/v) y peróxido benzoico (polimerizador) (50 g/L) (Sigma-Aldrich) durante 24 h a 4°C; siendo posteriormente depositadas y orientadas adecuadamente sobre una base de metacrilato en un tubo de vidrio. Tras cubrir las muestras con esta mezcla, se dejó polimerizar durante aproximadamente dos semanas en estufa inicialmente a 30° C, incrementándose la temperatura 0,5° C cada día.

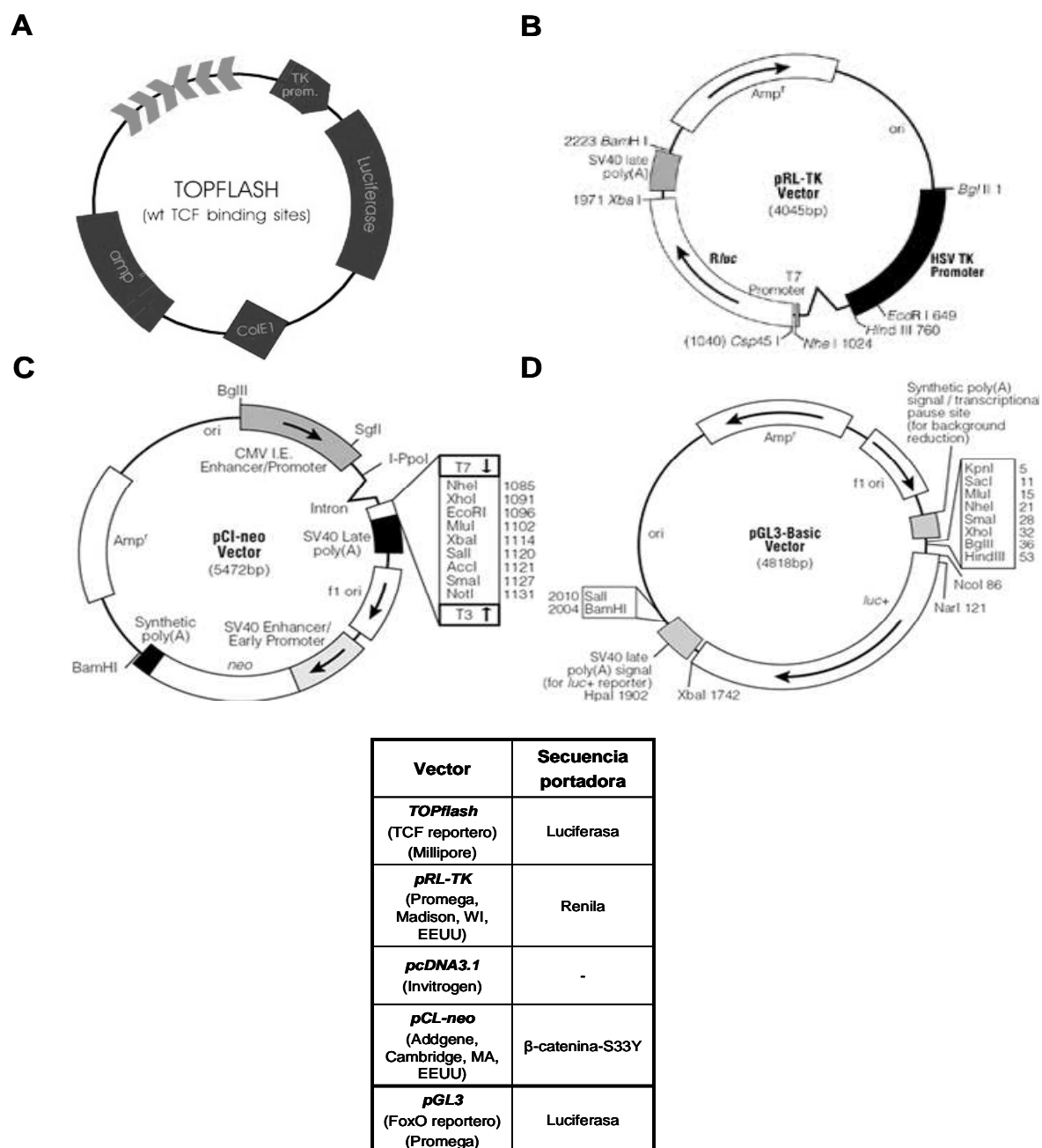


Fig. 13. Mapas de los vectores utilizados para determinar la actividad transcripcional de TCF y FoxO en células osteoblásticas. Se muestra el mapa de los plásmidos para analizar la actividad transcripcional TCF (A,B) y del plásmido pCL-neo- β -catenina S33Y que codifica una β -catenina no degradable (C), así como para evaluar la actividad de FoxO (B y D). En los experimentos con el plásmido pCL-neo- β -catenina-S33Y se transfectó en paralelo el plásmido pcDNA3.1 vacío como control (Ver la Fig.8 en el apartado 3.1.1.2). En la parte inferior se muestra una tabla con la secuencia portadora de cada uno de estos plásmidos.

Tras la polimerización, se cortó el exceso de metacrilato con una sierra vertical para aproximar el plano de corte al tejido y, a continuación, se realizaron cortes seriados de 7 μm lo más cercanos al eje sagital de la columna con un microtomo Leica RM 2255. Dichos cortes se depositaron en portas pre-tratados con gelatina de Haupt (disolución acuosa de gelatina en polvo, glicerina y fenol), se cubrieron con una lámina de polietileno y se prensaron durante 20-24 h a 60°C.

Antes de teñir las muestras, éstas se desplastificaron en metil-acetato (Merck) durante 15-30 min. A continuación, se rehidrataron con etanol a concentraciones decrecientes (absoluto, 70% y 50%) durante 5 min cada vez y se lavaron por inmersión en agua destilada.

La tinción de Von Kossa está basada en la reacción de los iones de plata con el fosfato y el carbonato cálcico presentes en el hueso, sustituyendo al calcio. Por exposición a la luz ambiental, los iones de plata se reducen, precipitando el metal (color negro), marcando así de forma específica el hueso mineralizado [192]. Esta tinción permite visualizar el ribete de osteoide de color rojo intenso (a la luz polarizada) frente al hueso mineralizado de color negro. Tras las tinciones, las muestras se deshidrataron y se montaron con resina DPX (una mezcla de distireno, plastificante y xilol) (VWR, Lovaina, Bélgica).

Para determinar los parámetros histomorfométricos, se utilizó un micrómetro acoplado a una retícula rectangular en el ocular del microscopio (*Olympus BX41*, Olympus, Melville, NY, EE.UU.), según técnica estandarizada [193]. Se analizaron las muestras a 4 aumentos para determinar el volumen trabecular total (BV/TV), el grosor medio trabecular (Tb. Th), el número de trabéculas (Tb. N) y la separación entre trabéculas (Tb. S), según criterios de la *American Society for Bone and Mineral Research* [194]. Estos parámetros fueron evaluados de manera independiente por 2 observadores.

3.3.10. Análisis de μCT

Las muestras de fémur fueron escaneadas empleando un sistema de microtomografía de alta resolución (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Suiza) con un tamaño de voxel (pixel en 3D) de 10 μm^3 , un voltaje de 55 kVp, una intensidad de 145 μA y un tiempo de integración de 200 ms (b-Cube[®], Brüttisellen, Suiza). El volumen analizado en el compartimento trabecular de la metáfisis distal se seleccionó a partir del 66% de la longitud total del fémur desde su extremo proximal hasta la placa de crecimiento del extremo distal. Los parámetros corticales se analizaron en un anillo diafisario de 1 mm de altura situado a una longitud correspondiente al 56% desde el extremo proximal del fémur (Fig.14).

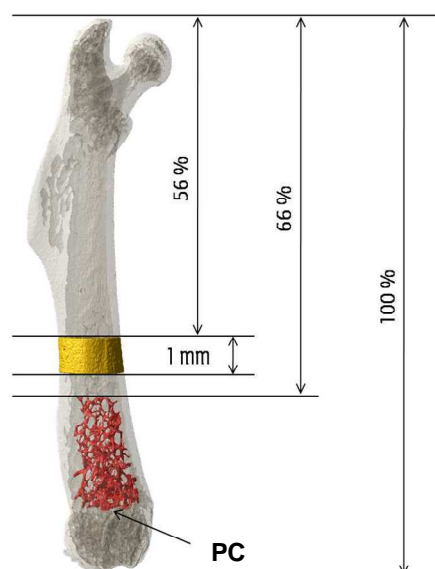


Fig.14. Regiones de interés seleccionadas en el fémur de los ratones para su análisis con μ CT. La región cortical aparece coloreada en amarillo en la diáfisis, mientras que el compartimento trabecular se señala en color rojo en la metáfisis femoral distal. PC: placa de crecimiento.

El análisis se realizó en 100 cortes virtuales seriados en dicha región cortical; mientras que en la región trabecular, se evaluó un número variable de cortes virtuales, dada la diferencia de longitud del fémur entre los ratones control e *Igf1*-nulos. La reconstrucción y posterior visualización de la microarquitectura en 3D y el cálculo de los parámetros estructurales en ambas regiones cortical y trabecular se realizó utilizando el programa MFEM, R-10 V1.2 (b-Cube AG, Schlieren, Suiza) (Tabla V).

3.3.11. Histología ósea

Las tibias fueron fijadas en p-formaldehído al 4% y mantenidas en TSF a 4°C toda la noche. A continuación, fueron descalcificadas con la solución *Osteosoft* (Merck) durante 72 h, y seguidamente se deshidrataron en etanol a concentraciones crecientes y xilol. Finalmente, se incluyeron en parafina orientándolas de forma conveniente para efectuar cortes en el plano sagital. Se realizaron secciones de 3 μ m, que fueron depositadas sobre portaobjetos pretratados con L-lisina (*Polysine slides*, Thermo-Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) durante 6 h a 60°C para fijar el tejido al portaobjetos. Por último, se rehidrataron mediante tratamiento secuencial con xilol, etanol absoluto, etanol al 70% y agua destilada.

Tabla. V. Parámetros trabeculares y corticales en el fémur de ratón calculados a partir del análisis histomorfométrico o de micro-CT.

Parámetros trabeculares	
BV/TV (%)	Volumen trabecular total: Relaciona el volumen de tejido óseo calcificado respecto del volumen total del área analizada.
BS/TV (mm⁻¹)	Densidad de superficie ósea: Relaciona la superficie de tejido óseo mineralizado capaz de sufrir remodelado óseo respecto del volumen total del área analizada.
Tb.Th (μm)	Espesor trabecular: Grosor medio de las trabéculas óseas calculado a partir de una reconstrucción 3D
Tb.N (mm⁻¹)	Número medio de trabéculas por unidad de longitud (milímetro lineal) en el área trabecular.
Tb.S (μm)	Separación media entre aquellas superficies óseas que bordean la cavidad medular.
Conn.D (mm⁻³)	Medida del grado de cómo una estructura se encuentra conectada de manera múltiple.
Parámetros corticales	
T.Ar (mm²)	Área de hueso cortical: Determina el área total del corte transversal de la región cortical de interés.
Ct.Th (mm)	Espesor cortical: Grosor medio del tejido mineralizado de una serie de cortes transversales de la región cortical de interés.
J (mm⁴)	Momento medio de inercia: resistencia ofrecida a la rotación en torno al eje longitudinal del hueso en varios cortes virtuales en el plano transversal de esta región asumiendo propiedades biomecánicas materiales uniformes.

Las muestras parafinadas se tiñeron con tricrómico de Masson (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta tinción permite observar con nitidez la celularidad del hueso, observándose el citoplasma en color rojo-rosado y el núcleo en azul oscuro o negro. La matriz ósea decalcificada se tiñe de color azul intenso cuanto más inmadura.

Tras la tinción, las muestras se deshidrataron y montaron con resina DPX. Se examinaron dos secciones histológicas por ratón de un total de 4 ratones por cada grupo experimental, realizándose microfotografías de 3 campos en cada muestra utilizando un objetivo 20x (Leica, Heerbrugg, Suiza). El número de osteocitos, osteoblastos y osteoclastos se cuantificó a partir del conteo obtenido por 3 observadores independientes.

3.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). Se utilizó test de ANOVA seguido de una prueba *post-hoc* (LSD) para comparar varias muestras entre sí cuando cumplían criterios de normalidad y homocedasticidad, y Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post-hoc* (Dunn) en aquellas muestras que requerían análisis no paramétrico. La comparación paramétrica entre dos grupos se realizó mediante la prueba t de *student*; mientras que en aquellas comparaciones no paramétricas se realizó la prueba de Mann Whitney. Todos los valores con $p < 0,05$ fueron considerados significativos. Los análisis fueron llevados a cabo empleando el software informático Graphpad InStat (San Diego, CA, EE.UU.).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización del efecto de la AG en células osteoblásticas MC3T3-E1. Papel citoprotector de la autofagia.

Para evaluar el efecto de la AG sobre la viabilidad osteoblástica, se cultivaron las células MC3T3-E1 en un medio suplementado o no (control) con AG (25 mM) durante 48 h. Observamos que la AG inducía una disminución significativa de la viabilidad de estas células (Fig.15).

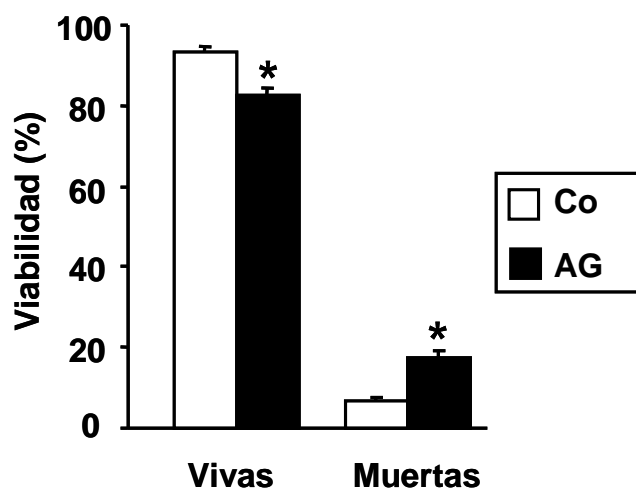


Fig.15. Viabilidad de las células MC3T3-E1 expuestas a alta glucosa (AG). Estas células fueron cultivadas en presencia o ausencia (Control, Co) de AG (25 mM) durante 48 h. La viabilidad representa el % de células vivas o muertas (n° de células $\times 100 / n^{\circ}$ de células totales) según la exclusión o admisión de azul tripán. Los resultados son media \pm EEM de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0.05$ vs Co.

A continuación, evaluamos la posible respuesta protectora autofágica en las células osteoblásticas expuestas a AG durante 48 h, determinando los niveles de las isoformas I y II del marcador de autofagia LC3B. El flujo autofágico se bloqueó las últimas 24 h mediante la adición de CQ, un agente que impide la fusión de los lisosomas al autofagosoma. El análisis de la expresión proteica por inmunotransferencia reveló un incremento de ambas isoformas de LC3B tras el tratamiento con AG o con CQ, que fue mayor con ambos tratamientos combinados (Fig.16).

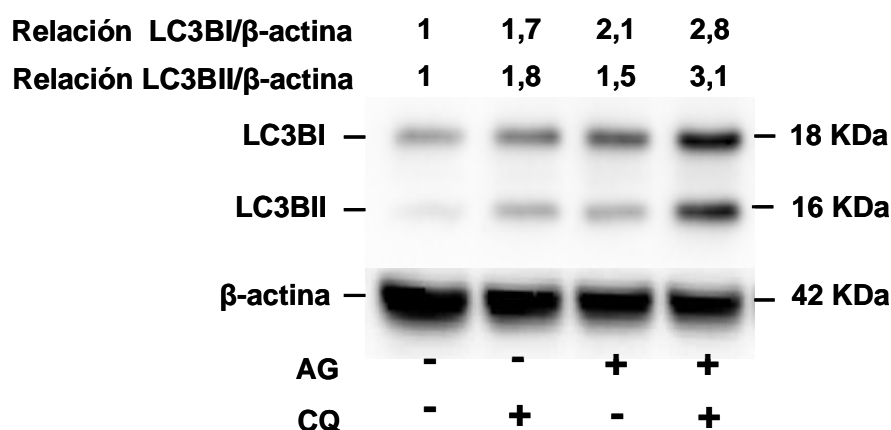


Fig.16. Expresión de LC3B en células MC3T3-E1 expuestas a AG. Representación de un autoradiograma mostrando la expresión proteica de las isoformas LC3BI y LC3BII en células MC3T3-E1 mantenidas durante 48 h en condiciones de glucosa normal o AG. La adición de CQ (10 μ M) se realizó 24 h antes de la extracción proteica. Se muestran las intensidades relativas (parte superior) de la señal de LC3BI y LC3BII correspondientes a cada condición experimental referidas a su respectivo control tras ser normalizadas con β -actina. Esta imagen es representativa de 3 experimentos independientes.

Una vez corroborada la inducción de autofagia por la AG, se desarrolló una línea estable de células MC3T3-E1 con inhibición de la autofagia mediante silenciamiento génico con un ARN de horquilla corta (*shARN*) de ATG7. Para anular la expresión de esta proteína en las células MC3T3-E1 se probaron dos secuencias de *shARN*, que permitieron la obtención de dos subclones diferentes con diferentes grados de inhibición de dicha expresión. Debido a que el subclon 1 demostró ser más eficaz que el 2 en la disminución de la expresión génica y proteica de Atg7 (Fig. 17A-B), se seleccionó este subclon en posteriores experimentos.

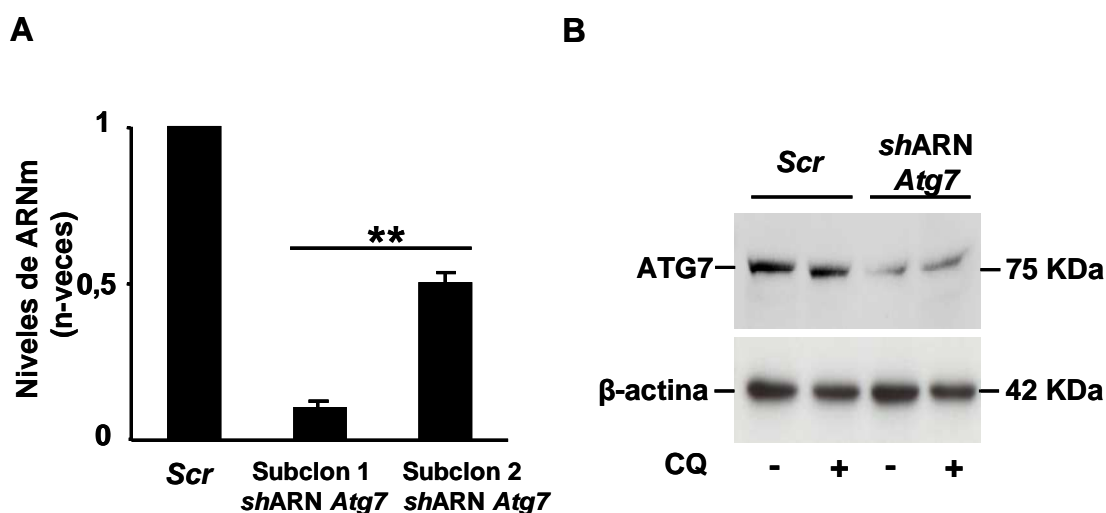


Fig. 17. Caracterización de las células MC3T3-E1 con silenciamiento de Atg7. (A) Expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de *Atg7* en los subclones 1 y 2 tras la infección estable mediante lentivirus con el vector vacío (*Scrambled*, *Scr*) o con *shARN* de *Atg7*. (B) Autoradiograma representativo de la expresión proteica de ATG7 en células *Scr* o del subclon 1 *shARN Atg7*. Los resultados son media \pm EEM de 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$ vs *Scr*.

Dada la estrecha asociación entre la producción de ROS, la AG y la inducción de autofagia [195, 196], hipotetizamos el posible papel protector de esta última modulando el estrés oxidativo en los osteoblastos en condiciones de AG. Así, células MC3T3-E1 infectadas con un lentivirus portador de *shARN Atg7* o el vector vacío (*Scrambled*) se trataron con H_2O_2 (100 μ M) o se mantuvieron en AG durante 48 h. La concentración de H_2O_2 elegida se basó en un estudio previo en el que se evaluaron diferentes concentraciones y su efecto sobre la viabilidad de las células MC3T3-E1 (Fig.18A). Encontramos que la exposición a la AG o al oxidante H_2O_2 indujo un aumento de ROS en estas células y que esta producción fue mayor en las células *shARN Atg7* con autofagia inhibida (Fig.18C).

Como control de especificidad del sistema, examinamos el efecto neutralizante de antioxidantes en situación de autofagia intacta o impedida. Previamente, se realizó un estudio de dosis-respuesta de dos antioxidantes ampliamente utilizados, NAC y catalasa, en células expuestas a la AG. Sorprendentemente, encontramos que concentraciones de 1-5 mM de NAC y de 200-1000 U/ml de catalasa producían un incremento de ROS; por lo que se establecieron como concentraciones idóneas de trabajo 0,4 mM de NAC y 100 U/ml de catalasa que demostraron capacidad antioxidante (Fig.18B). El tratamiento con dichos antioxidantes a estas concentraciones redujo la producción de ROS inducida por la AG en las células MC3T3-E1 en situación de autofagia intacta o inhibida (Fig.18C).

Posteriormente, se analizó el efecto protector de la autofagia, inducida de forma química o crónica, sobre la supervivencia de las células MC3T3-E1 expuestas a la AG. Observamos un incremento significativo de la apoptosis en estas células tratadas con CQ respecto al control, tanto en situación de glucosa normal o AG (mayor efecto apoptótico) (Fig.19A). Un efecto similar se observó en células *shARN Atg7* (Fig.19B). Además, de manera coherente con estos resultados, se observó una disminución de la viabilidad celular tras el tratamiento con AG y H_2O_2 de ambos tipos de células MC3T3-E1, controles y *shARN Atg7*, siendo mayor en estas últimas. El tratamiento con NAC y catalasa previno este efecto deletéreo en ambos tipos celulares (Fig.19C).

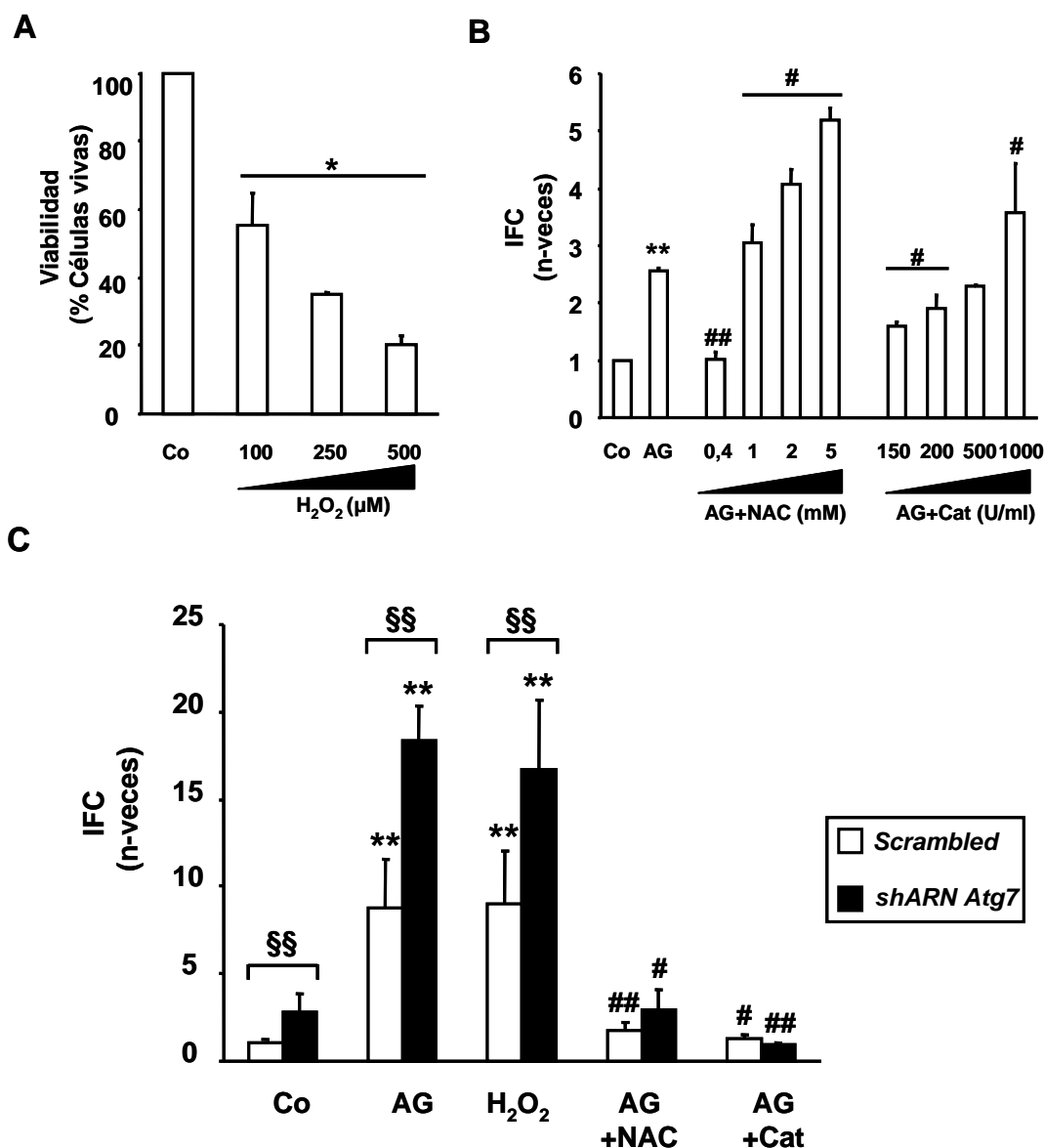


Fig.18. Efecto del H₂O₂ y la AG sobre la producción de ROS en células MC3T3-E1 con o sin inhibición de autofagia. (A) Dosis-respuesta del efecto del H₂O₂ sobre la viabilidad de estas células expuestas o no (Control, Co) al oxidante en pulsos de 2 h durante 2 d. (B) Dosis-respuesta del efecto de los antioxidantes N-acetilcisteína (NAC) y catalasa (Cat) sobre la producción de ROS en células MC3T3-E1 control (*Scrambled*) expuestas a AG. (C) Producción de ROS en células MC3T3-E1 con o sin inhibición de la autofagia, tras la exposición a AG o H₂O₂ durante 48 h. Los antioxidantes NAC (0,4 mM) y catalasa (100 U/ml) fueron añadidos al medio celular 15 minutos previos al estímulo con AG. La medida de la fluorescencia se realizó 2 h después del último estímulo con la AG o el H₂O₂. (IFC: Incremento de la fluorescencia celular). Los resultados corresponden a la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes por triplicado. *p<0,05; **p<0,01 vs Co respectivo; #p<0,05; ##p<0,01 vs AG respectivo; §§p<0,01.

Estos resultados en conjunto, demuestran el efecto protector de la autofagia sobre la viabilidad de las células osteoblásticas.

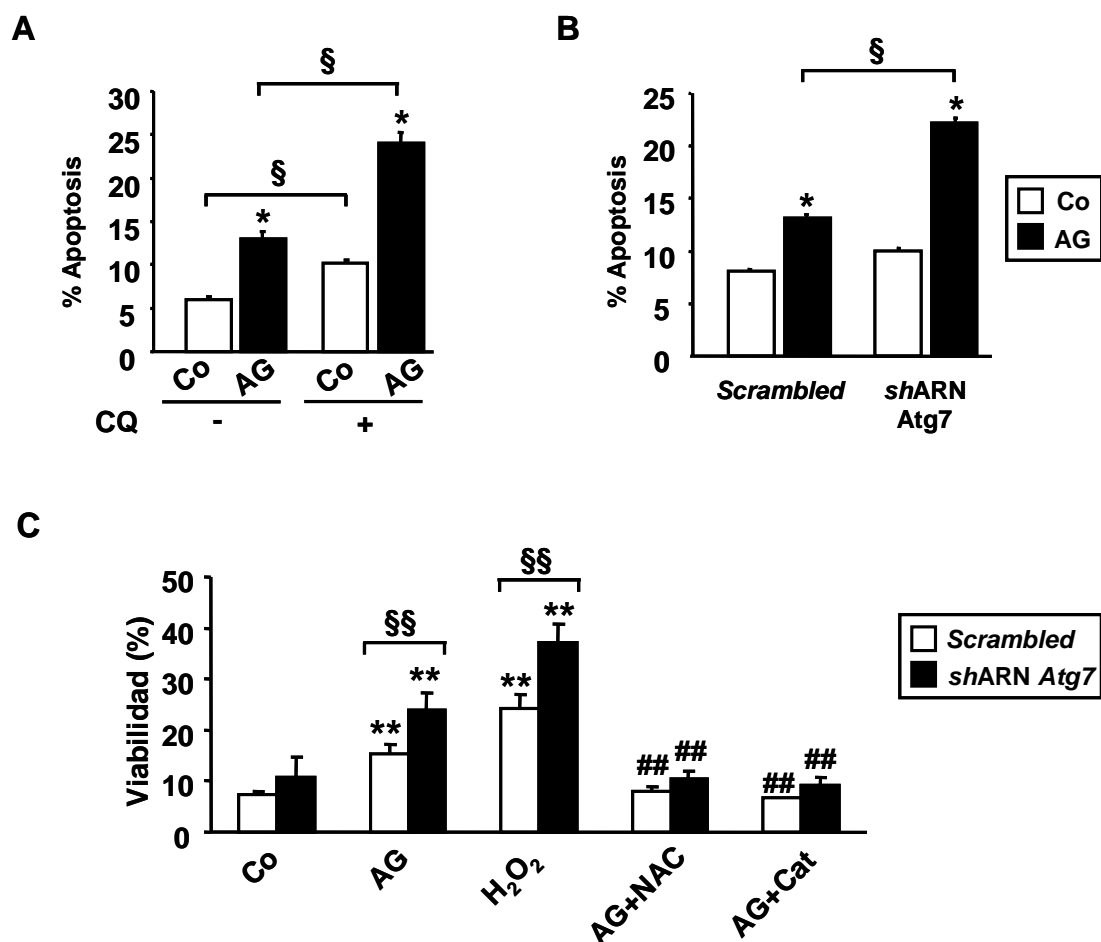
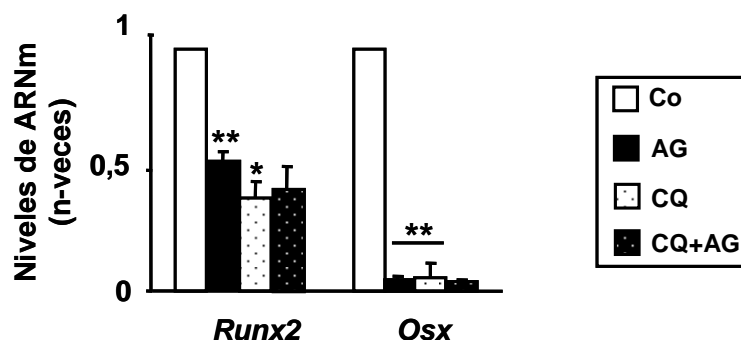


Fig.19. Efecto de la inhibición de la autofagia sobre la viabilidad de las células MC3T3-E1 en situación de estrés oxidativo. Las células se cultivaron durante 48 h en presencia o no (Control, Co) de AG, H₂O₂, antioxidantes y/o CQ (10 μ M) durante las últimas 24 h. (A) Cuantificación del % de apoptosis definido como n° de células con marcaje positivo para Anexina V y yoduro de propidio (apoptosis temprana y tardía, respectivamente) en células MC3T3-E1 nativas y (B) en células infectadas con lentivirus portadores del vector vacío (*Scrambled*) o con *shARN Atg7*. (C) Cuantificación de la viabilidad celular, definida por el n° de células muertas $\times 100 / n^\circ$ de células totales, en células *Scrambled* y *shARN Atg7* estimuladas con AG, pre-incubadas o no con los antioxidantes NAC (0,4 mM) o catalasa (Cat) (100 U/ml) durante 15 min o con H₂O₂. Los resultados representan la media \pm EEM de al menos 3 experimentos realizados por duplicado para cada condición experimental. *p<0,05; §p<0,01 vs Co respectivo; #p<0,05; ##p<0,01 vs AG respectivo; §p<0,05; §§p<0,01.

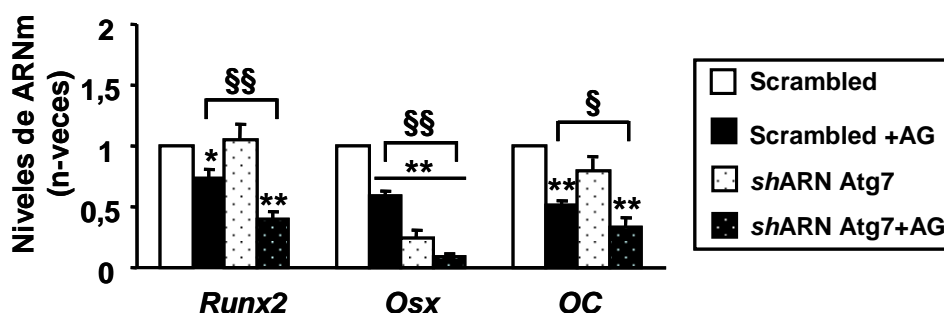
Por otra parte, la exposición de las células MC3T3-E1 a la AG disminuyó la expresión de genes clave en la diferenciación osteoblástica, *Runx2* y *Osx*, respecto al control. En condiciones de autofagia inhibida, se observó una disminución similar en la expresión de estos genes, especialmente *Osx* (Fig.20A). La inhibición crónica de la autofagia en estas células potenció el efecto deletéreo de la AG sobre ambos genes de diferenciación osteoblástica temprana (*Runx2* y *Osx*) y en *Oc*, un gen más tardío en dicha diferenciación (Fig.20B). Además, se observó una disminución de la mineralización en las células *shARN Atg7* respecto a sus controles, sobretudo en presencia de AG (Fig.20C).

Estos resultados indican el papel protector de la autofagia sobre la diferenciación osteoblástica alterada por la AG.

A



B



C

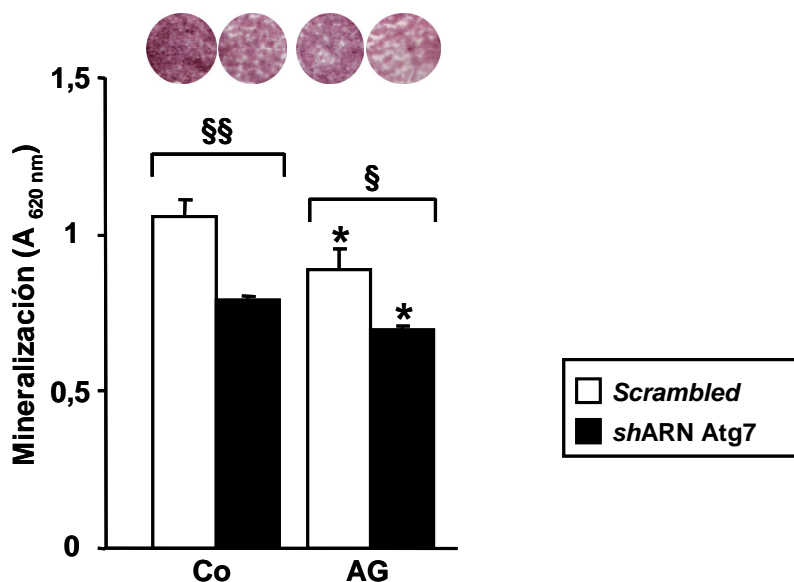
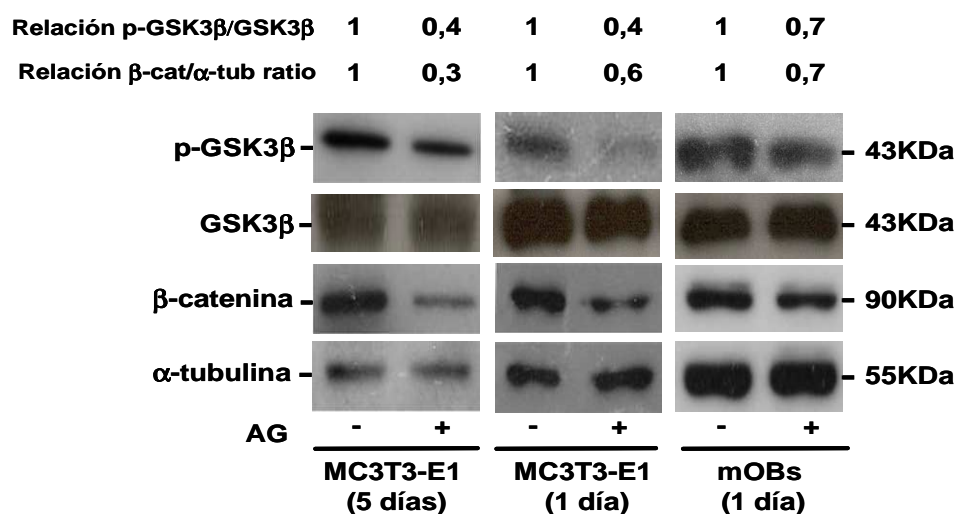


Fig. 20. Efecto protector de la autofagia sobre la disminución de la diferenciación osteoblástica inducida por la AG en las células MC3T3-E1. (A) Análisis de la expresión génica (por PCR a tiempo real) de *Runx2*, *Osx* (A) y *Oc* (B) en células MC3T3-E1 nativas expuestas a AG durante 48 h y a CQ las últimas 24 h y (B) en células que expresan *shARN Atg7* (o sus controles *Scrambled*). Los resultados representan la media \pm EEM de 5-6 réplicas por condición experimental en 2 experimentos independientes. (C) La capacidad de mineralización de estas células se evaluó por tinción de rojo de alizarina S tras 10 d en un medio de diferenciación osteogénica, con o sin AG (Control, Co). Los resultados se expresan como media \pm EEM de 2 experimentos con triplicados de cada condición experimental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Co respectivo; § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$

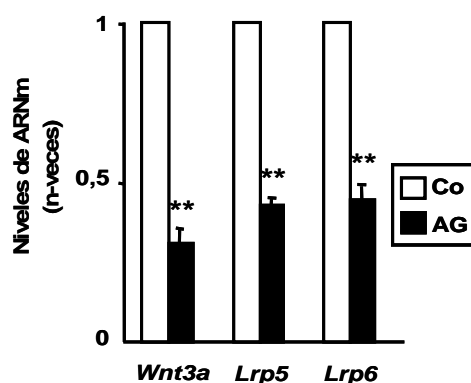
4.2. Efecto de la AG sobre la activación de la vía Wnt/ β -catenina en células osteoblásticas

En primer lugar, analizamos la expresión de dos proteínas clave en la vía Wnt canónica, la p-GSK3 β y la β -catenina, en las células MC3T3-E1 y en osteoblastos primarios de calotas murinas, *mOBs*. Observamos que la exposición aguda (24 h) o crónica (5 días) a AG indujo una disminución de los niveles proteicos de ambas proteínas en estas células (Fig.21A).

A



B



C

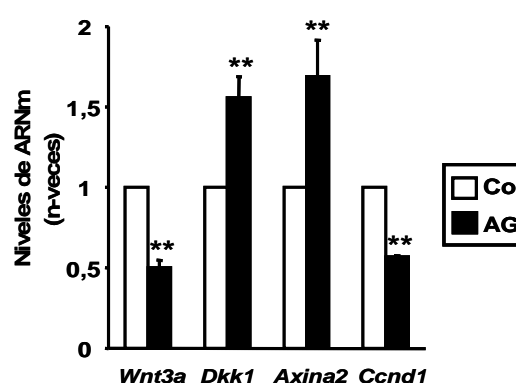


Fig.21. Efecto de la AG sobre distintos componentes de la vía Wnt/ β -catenina en células osteoblásticas. (A) Autoradiograma representativo de los cambios en la expresión proteica de p-GSK3 β y β -catenina inducidos por la AG (25 mM) en células MC3T3-E1 y *mOBs*. Las intensidades relativas a la señal de ambas proteínas, normalizadas con los niveles respectivos de GSK3 β total y α -tubulina, se indican en la parte superior (incremento en relación a su control). (B y C) Cambios en la expresión (analizada por PCR a tiempo real) de genes relacionados con la vía Wnt canónica inducidos por la exposición o no (Control, Co) a AG durante 5 d en células MC3T3-E1 (B) y C3H10T1/2 (C). Los valores se expresan como media \pm EEM de 5-6 réplicas por condición experimental. * $p < 0,01$ vs Co.

A continuación, evaluamos los posibles mecanismos por los que la AG afecta negativamente a la vía Wnt/ β -catenina en las células osteoblásticas. Inicialmente, analizamos la expresión de genes clave en la activación de esta vía en células con diferente grado de diferenciación osteoblástica, MC3T3-E1 (Fig.21B) y C3H10T1/2 (Fig.21C), expuestas a la AG: *Wnt3a*, *Lrp5* y *Lrp6* (activadores); *axina2* (diana final y regulador negativo de la vía); *Dkk1* (inhibidor); y *Ccnd1* (diana final de la vía). Encontramos diferencias en la expresión de estos genes por la AG en ambas líneas celulares.

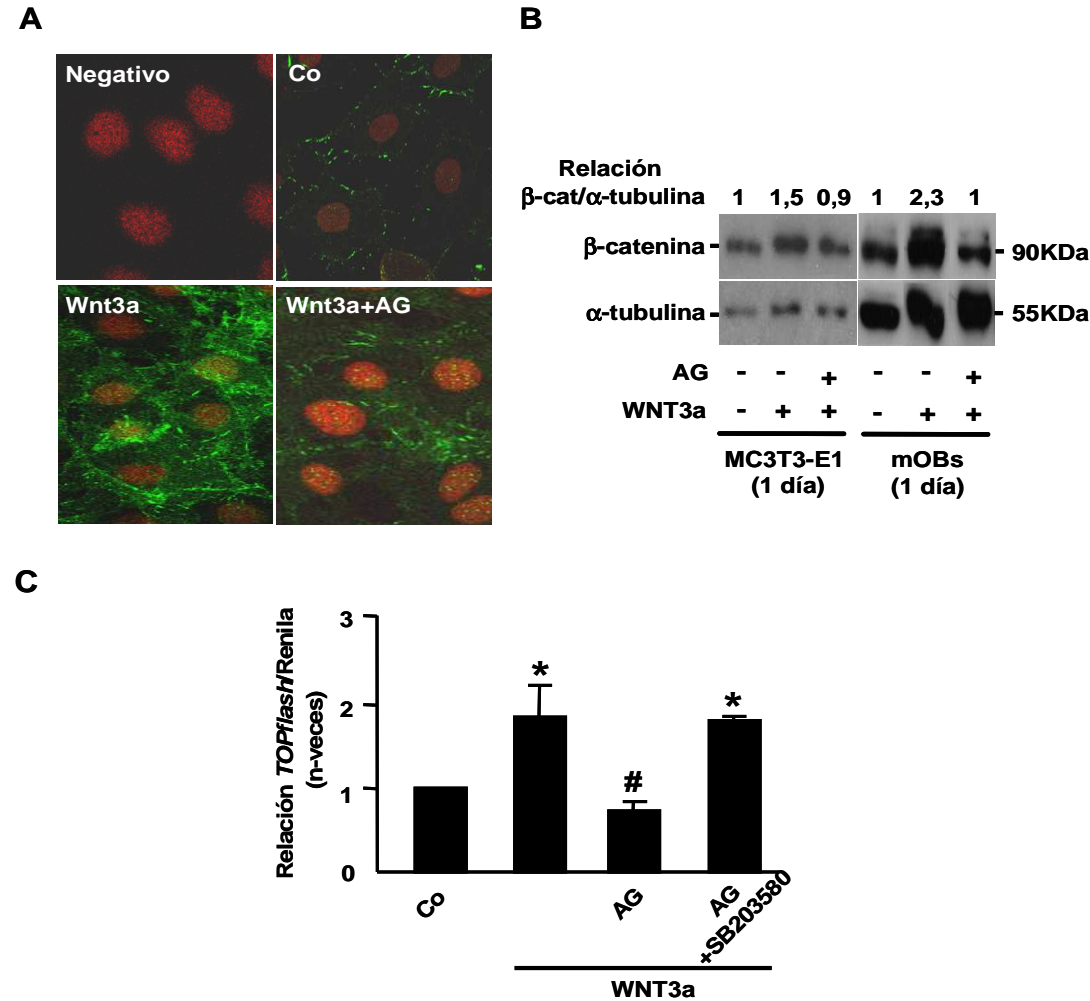


Fig.22. La AG ejerce efectos distales a WNT3a sobre la desestabilización de β -catenina en células osteoblásticas. (A) Las células MC3T3-E1 se incubaron en condiciones de glucosa normal (5,5 mM) o AG (25 mM) durante 5 días, en presencia o ausencia (control, Co) de WNT3a durante las últimas 24 h. Se realizó una doble tinción inmunofluorescente para la visualización de los núcleos (yoduro de propidio, rojo) y de la β -catenina (anticuerpo primario marcado con isotiocianato de fluoresceína, verde). Se muestra un control negativo sin anticuerpo primario. (B) Autoradiograma representativo mostrando la expresión proteica de β -catenina en células MC3T3-E1 y mOBs expuestas o no a la AG, con o sin WNT3a, durante 24 h. Se muestran las intensidades relativas (parte superior) de la señal de β -catenina (normalizada con la de α -tubulina) para cada condición experimental referidas al control. (C) Actividad transcripcional de β -catenina en células MC3T3-E1 pre-incubadas con glucosa normal (control, Co) o AG durante 48 h, y posteriormente co-transfectadas con un plásmido *TOPflash-TCF* y un plásmido para la expresión de renilla (normalizador). Al día siguiente de la transfección, las células se expusieron durante 24 h a AG, en presencia o ausencia de WNT3a y/o del inhibidor de p38-MAPK, SB203580 (10 μ M). El inhibidor fue añadido a los cultivos correspondientes 2 h previas a la AG. Los resultados corresponden al menos a 3 experimentos independientes por triplicado. * $p < 0,05$ vs Co; # $p < 0,05$ vs WNT3a.

Con objeto de dilucidar las posibles interacciones de la AG con mecanismos distales a estos componentes de la vía Wnt, se plantearon varias alternativas experimentales. Por un lado, utilizando inmunocitoquímica e inmunotransferencia, observamos que la presencia de AG en el medio de las células osteoblásticas (MC3T3-E1 y mOBs) prevenía la estabilización de β -catenina activada con WNT3a exógena (Fig. 22A-B). Apoyando estos resultados, encontramos una disminución inducida por la AG en la actividad transcripcional de β -catenina mediante un ensayo de luciferasa *TOPflash-TCF* en las células MC3T3-E1 estimuladas con medio con WNT3a exógeno (Fig. 22C). Por otro lado, se sabe que la AG estimula la vía p38-MAPK en situaciones de estrés y que, además, induce apoptosis en las células osteoblásticas [197, 198]. Observamos que la presencia de un inhibidor de p38-MAPK junto a la AG en las células MC3T3-E1, recuperaba la capacidad del WNT3a para inducir la actividad transcripcional de la β -catenina (Fig.22C).

Estos resultados indican que la AG produce efectos negativos no solo a nivel de ligando, sino también a niveles más distales en la vía canónica de Wnt en las células osteoblásticas.

A continuación, estudiamos la posible interacción de la AG con la actividad de la GSK3 β . Se ha descrito previamente el efecto del LiCl sobre la estabilización de β -catenina por inhibición de la GSK3 β [199]. Observamos que la exposición a AG disminuyó la actividad transcripcional de β -catenina inducida por LiCl en las células MC3T3-E1, determinada por actividad de TCF (Fig.23A) o por expresión de genes finales de esta vía canónica (*Opg*, *Runx2*, *Ccnd1*, *Lef1* y *Cx43*) (Fig.23B). Además, en estas mismas condiciones, se observó un efecto deletéreo de la AG sobre la expresión proteica de β -catenina citosólica inducida por el LiCl (Fig.23C).

Estos hallazgos indican que, aun promoviendo la estabilización de la β -catenina mediante la inhibición de GSK3 β , no se logra revertir el efecto deletéreo de la AG sobre la vía canónica de Wnt en las células osteoblásticas.

Considerando estos resultados, propusimos una estrategia alternativa transfectando las células MC3T3-E1 con un plásmido codificante para una β -catenina mutada en Ser33 (β -catenina-S33Y), no reconocida por el proteasoma y, por tanto, no degradable [200]. Estas células transfectadas fueron cultivadas en presencia de AG durante 5 d, analizándose posteriormente la actividad transcripcional de β -catenina (con *TOPflash*). El análisis de dicha actividad reveló el aumento esperable en las células que sobreexpresaban β -catenina, que no se alteró por la AG, ni por la presencia del inhibidor de p38-MAPK SB203580 (Fig.24).

Estos resultados señalaban a la degradación de la β -catenina como un evento clave en la inactivación de la vía Wnt/ β -catenina inducida por la AG.

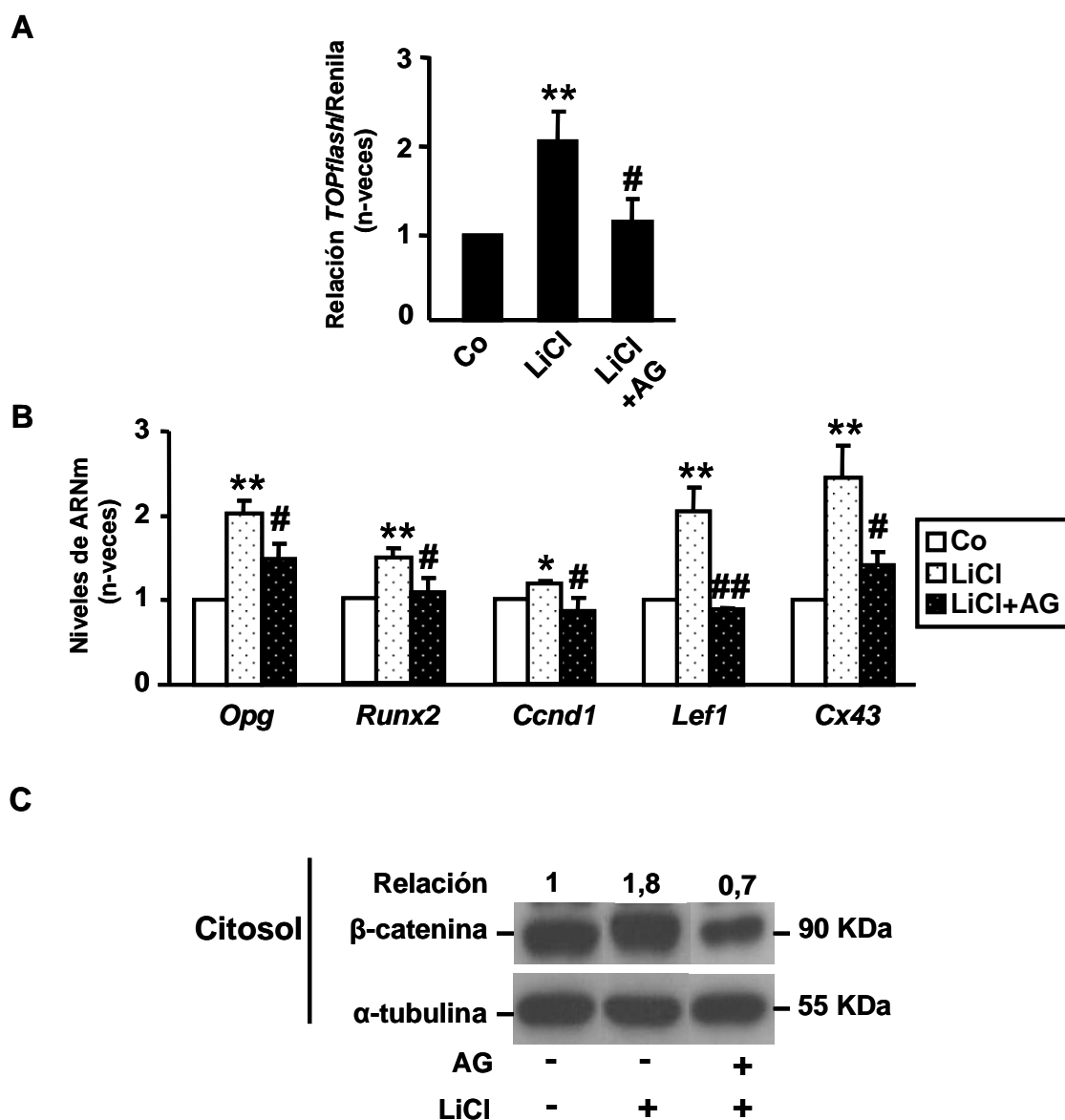


Fig.23. Efecto inhibitorio de la AG sobre la estabilización de la β -catenina inducida por LiCl. Las células MC3T3-E1 fueron pre-tratadas con glucosa normal (control, Co) o AG (25 mM) durante 48 h, en presencia de LiCl (25 mM). (A) Medida de la actividad transcripcional de TCF. Estas células fueron co-transfectadas con un plásmido TOPflash-TCF y un plásmido de renila como normalizador, siendo posteriormente, expuestas a LiCl y AG durante 24 h. (B) Cambios en la expresión (analizada por PCR a tiempo real) de genes finales de la vía Wnt/ β -catenina inducidos por la AG y/o LiCl. Los resultados representan la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes por triplicado (A) o de 5-6 réplicas por condición experimental (B). (C) Autoradiograma representativo de los cambios en la expresión proteica de β -catenina en la fracción citosólica de células MC3T3-E1 en presencia de AG y/o LiCl durante 5 d. Se muestran las intensidades relativas (parte superior) de la señal de β -catenina, normalizada con α -tubulina, para cada condición experimental referidas al control. Las bandas representadas provienen de un mismo gel de zonas distintas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Co; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs LiCl.

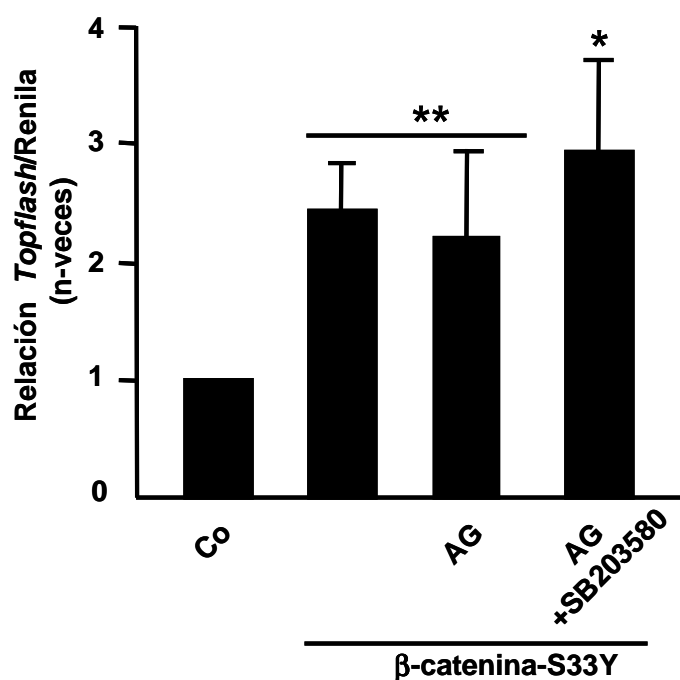
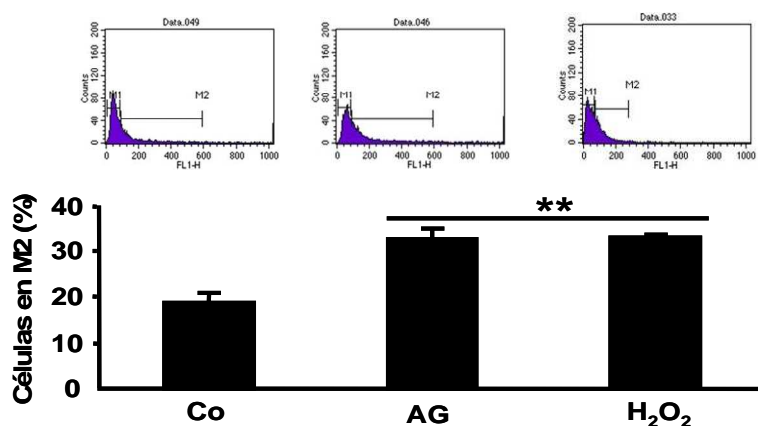


Fig.24. La AG no afecta la estabilización de β -catenina no degradable por el proteasoma en las células MC3T3-E1. Estas células fueron pre-tratadas con AG durante 48 h y, posteriormente, co-transfectadas con un plásmido de β -catenina-S33Y (mutada y no degradable), con el plásmido *TOPflash-TCF* y con un plásmido de renila (normalizador). A las 24 h de la transfección, fueron expuestas de nuevo a AG 24 h más en presencia o no del inhibidor de p38-MAPK (SB203580), añadido 2 h antes de la AG. Los resultados representan la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes por triplicado. $p < 0,05$; $p < 0,01$ vs control (Co).

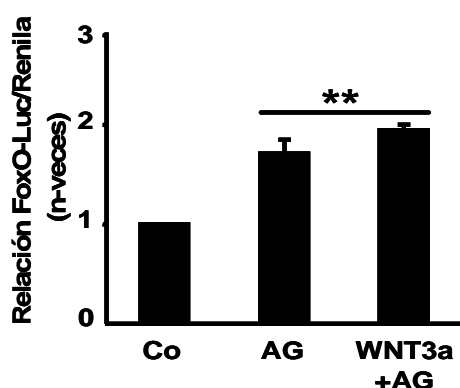
El estrés oxidativo, a través de sus efectos sobre la función osteoblástica, parece jugar un papel importante en el desarrollo de la osteopenia asociada a la DM . Por ello, posteriormente nos propusimos investigar si el estrés oxidativo podría contribuir a la inhibición de la vía Wnt por la AG en células osteoblásticas. Para ello, comprobamos la producción de ROS y la activación de genes *FoxO* (principal factor de transcripción de respuesta al estrés oxidativo) en las células MC3T3-E1 expuestas a la AG durante 24 h (Fig.25A). Observamos que el aumento de ROS se asociaba al incremento de dicha actividad (en presencia o ausencia de WNT3a) por la AG en estas células (Fig.25B). De modo coherente con estos resultados, la AG indujo en las células MC3T3-E1 un aumento de la expresión de genes modulados por *FoxO*, *catalasa* y *Gadd45* (Fig.25C). Además, este efecto inductor de la actividad *FoxO* por la AG era proporcional a su efecto negativo sobre la actividad transcripcional de β -catenina en estas células (Fig.22C y Fig.25B).

Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo producido por la AG contribuye a la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina en las células osteoblásticas.

A



B



C

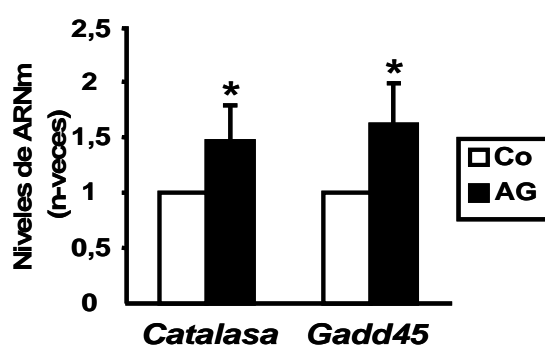
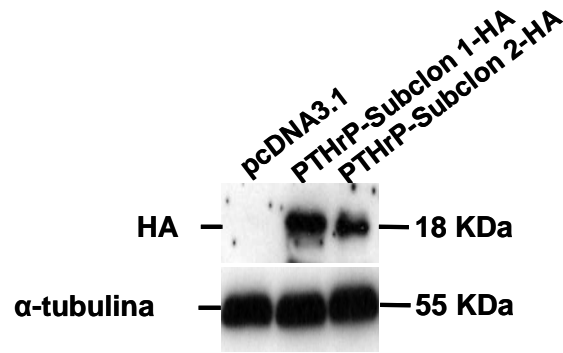


Fig.25. Efecto de la AG sobre el estrés oxidativo en células MC3T3-E1. Las células fueron expuestas o no (control, Co) a AG durante 24 h (A y C) o 5 d (B). (A) La producción de ROS se determinó en células marcadas con 2,7-DCFH-DA mediante citometría de flujo (los perfiles representativos de cada condición experimental se muestran en la parte superior). Como control positivo de producción de ROS se utilizó la estimulación con H₂O₂ (100 μ M) durante 10 min. (B) Cuantificación de la actividad transcripcional *FoxO* mediante transfección con un plásmido reportero *FoxO*-luciferasa y un plásmido de renilla como normalizador. Tras la transfección, las células fueron expuestas o no (Control, Co) a AG y WNT3a durante 24 h. (C) Cambios en la expresión (analizada por PCR a tiempo real) de genes relacionados con el estrés oxidativo. Los valores representados (media \pm EEM) corresponden al menos a 2-3 experimentos independientes realizados por triplicado para cada condición experimental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Co.

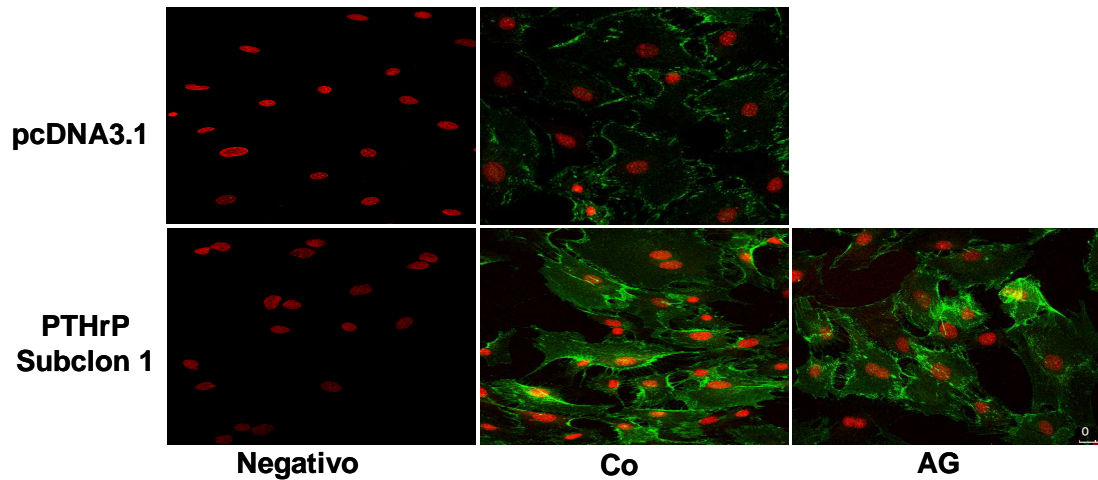
4.3 Interacción de los péptidos de la PTHrP con la vía Wnt/ β -catenina en células osteoblásticas

A continuación, procedimos a evaluar el posible efecto modulador de la PTHrP sobre la vía Wnt alterada por la AG en las células osteoblásticas. En primer lugar, utilizamos células MC3T3-E1 con sobreexpresión constitutiva de PTHrP (Fig.26A). Mediante microscopía confocal, las células del subclon 1 (que mostraban mayor expresión de PTHrP) mostraron una acumulación de β -catenina, citosólica y nuclear, independientemente de la presencia de AG en el medio (Fig.26B). Este hallazgo se corroboró analizando la expresión proteica de β -catenina por inmunotransferencia (Fig.26C). Así mismo, la actividad transcripcional de β -catenina –mediante *TOPflash*– estaba incrementada en ambos subclones 1 y 2 en presencia o ausencia de AG en el medio condicionado celular (Fig.26D).

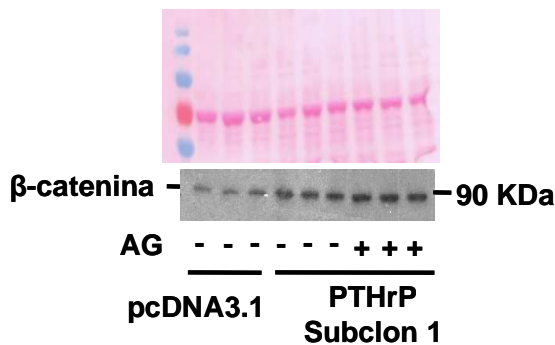
A



B



C



D

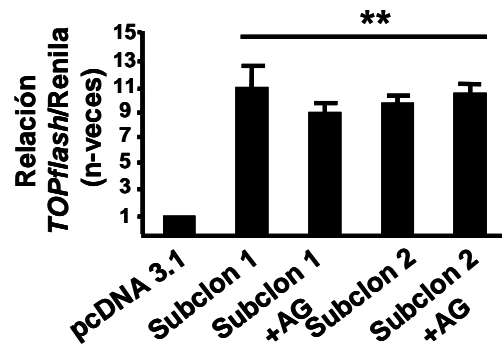
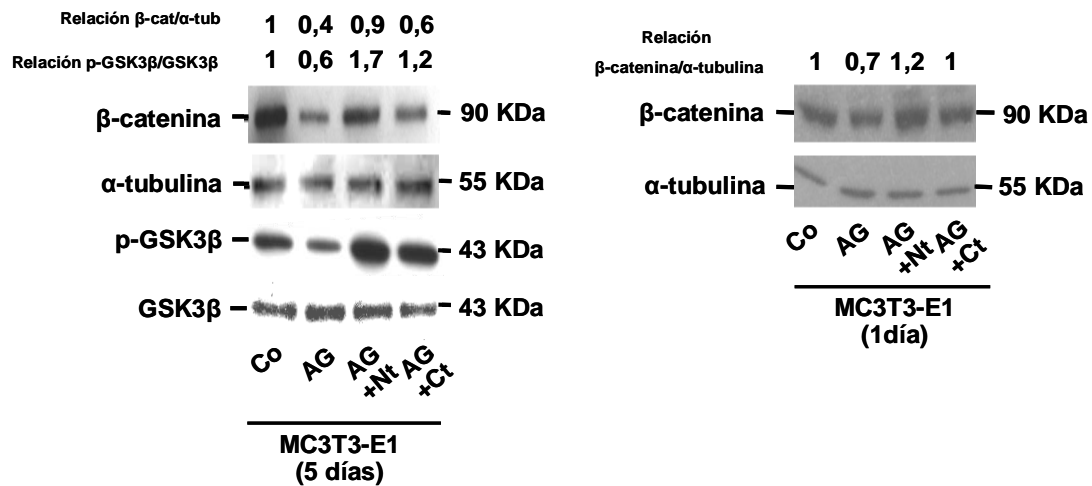


Fig.26. La AG no altera la activación de la vía Wnt en células MC3T3-E1 con sobreexpresión constitutiva de PTHrP. Las células fueron transfectadas de forma estable con un plásmido portador del ADNc de la PTHrP humana (-36/+139) con HA como marcador, o el plásmido vacío pcDNA3.1. (A) Autoradiograma representativo de la sobreexpresión proteica de PTHrP en dos subclones seleccionados. (B) Doble inmunofluorescencia con tinción nuclear (yoduro de propidio, rojo) y de β-catenina (isotiocianato de fluoresceína, verde) en estas células expuestas o no (Control, Co) a AG durante 24 h. Se muestra un control negativo con ausencia de anticuerpo primario. Las imágenes representan resultados de 2 experimentos independientes. (C) Cambios en la expresión proteica de β-catenina en células del subclon 1 mantenidas en presencia o ausencia de AG durante 24 h. Se muestra autoradiograma representativo de β-catenina en la parte inferior y su tinción con rojo Ponceau S como control de carga en la parte superior. (D) Células MC3T3-E1 de los subclones 1 y 2 fueron co-transfectadas con el plásmido reportero TOPflash-TCF y con un plásmido de renilla como normalizador, siendo después expuestas (o no) a AG durante 24 h. Los valores son media ± EEM de al menos 3 determinaciones independientes por triplicado. **p<0.01 vs pcDNA3.1.

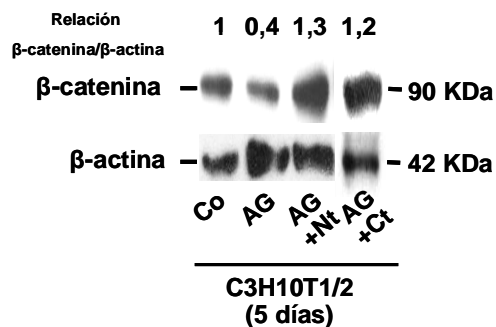
Además, decidimos estudiar el efecto de ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP sobre la activación de la vía Wnt en células osteoblásticas. Así, células con diferente grado de diferenciación osteoblástica MC3T3-E1, mOBs y mesenquimales

C3H10T1/2 en un medio osteogénico fueron expuestas a la AG, en presencia o ausencia de la PTHrP durante 1-5 d. Tanto la PTHrP (1-36) como la PTHrP (107-139) previnieron el efecto deletéreo de la AG sobre la β -catenina y/o la p-GSK3 β en estas células (Figs.27A-D).

A



B



C

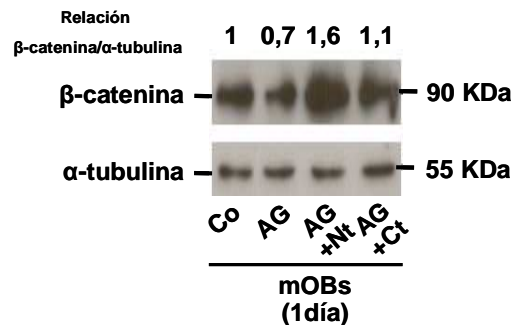


Fig.27. Efecto compensatorio de la PTHrP sobre la acción inhibitoria de la AG en la estabilización de β -catenina en células osteoblásticas. Autoradiogramas representativos de la expresión proteica de β -catenina y p-GSK3 β en células MC3T3-E1, C3H10T1/2 y/o mOBs. Las células fueron expuestas o no (Control, Co) a AG (25 mM) y a los fragmentos N-terminal (1-36) (Nt) y C-terminal (107-139) (Ct) de la PTHrP (100 nM) en un medio osteogénico durante 5 d (A, izq. y B) o 24 h (A, dcha. y C). En la parte superior de cada autoradiograma se muestran las intensidades relativas de la señal de β -catenina, como media normalizada con α -tubulina o β -actina, para cada condición experimental referidas al Co respectivo. Los resultados muestran valores representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Comprobamos que ambos péptidos de la PTHrP también revirtieron el efecto negativo de la AG sobre la expresión de *Wnt3a*, *Lrp5* y *Lrp6* en las células MC3T3-E1 (Fig.28A). Además, se analizó la acción de la PTHrP sobre la expresión de genes cuya transcripción está modulada por la β -catenina como son: *Runx2*, *Ccnd1*, *Lef1* y *Cx43* en estas condiciones experimentales. Al contrario que la AG, la L-glucosa (control osmótico) no afectó a la expresión de estos genes en estas células. Sin embargo, los péptidos de la PTHrP compensaron la alteración en la expresión de

estos genes de la vía canónica de Wnt; de modo similar a lo observado con PTH (1-34) en las células MC3T3-E1 (Fig.28B). Este efecto de la PTHrP era dependiente de la dosis en las células MC3T3-E1 y en mOBs, como se comprobó analizando la expresión de uno de estos genes más característicos, *Lef1* (Fig.28C).

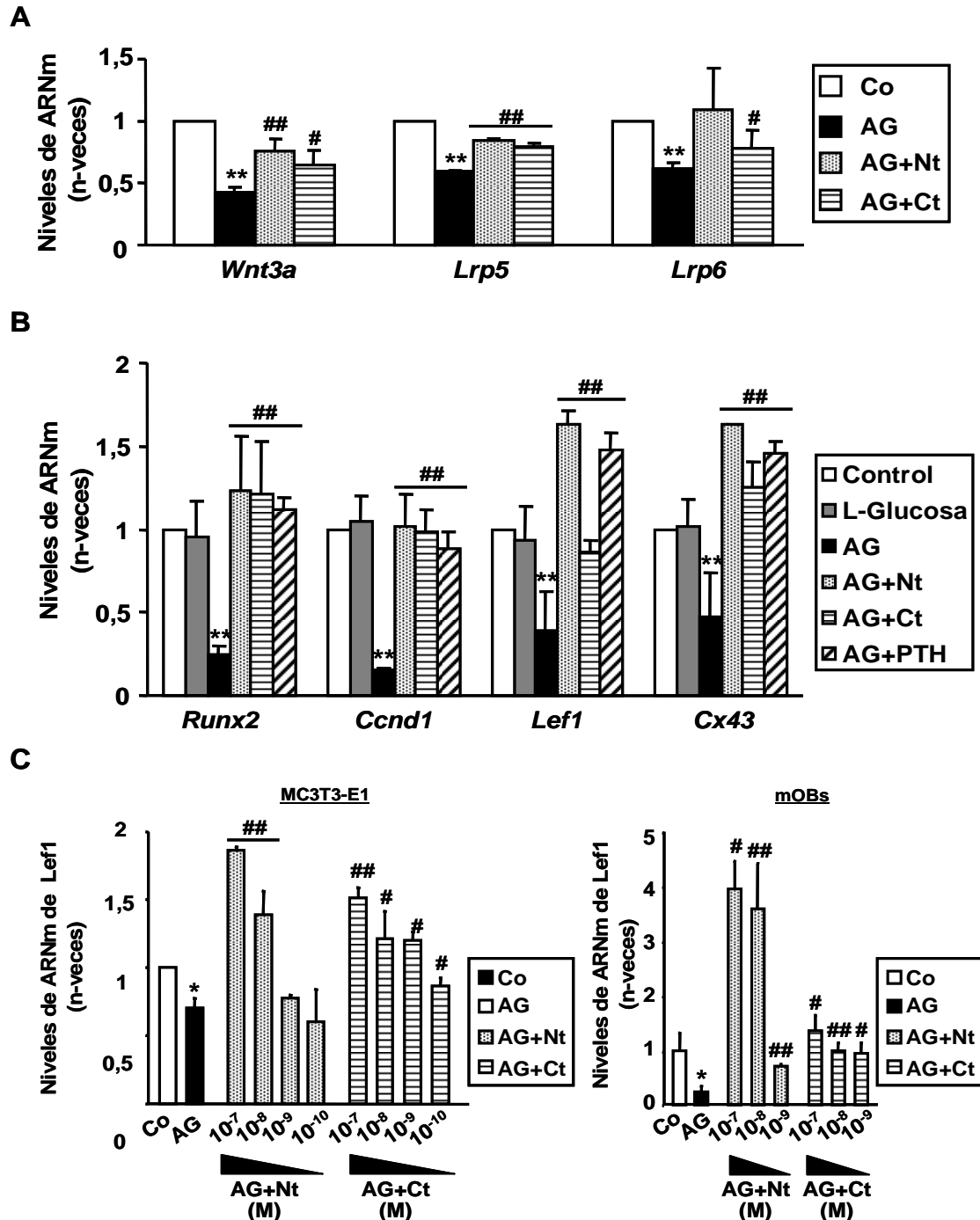


Fig.28. La PTHrP revierte las alteraciones inducidas por la AG en la expresión de genes de la vía Wnt/ β -catenina en células osteoblásticas. Cambios en la expresión (analizada por PCR a tiempo real) de genes tempranos (A) y genes diana (B,C) de la vía Wnt a los 5 d (A) o a 24 h (B,C) de exposición a AG (25 mM) en células MC3T3-E1 (A, B y C, izq.) y mOBs (C, dcha). Las células fueron cultivadas en presencia o ausencia (Control, Co) de AG, con o sin PTHrP (1-36) (Nt) o PTHrP (107-139) (Ct), a 100 nM (A,B) o a distintas concentraciones (C). La L-glucosa (25 mM) y la PTH (1-34) (100 nM) se utilizaron como control osmótico de la AG y control positivo activador de la vía Wnt, respectivamente. Los resultados representan la media \pm EEM de 2 experimentos con triplicados para cada condición experimental. $p < 0,05$; $p < 0,01$ vs Co; $\# p < 0,05$; $\#\# p < 0,01$ vs AG.

Para ratificar la especificidad de las vías de señalización asociadas a diversas acciones osteogénicas de los fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP [201, 202] sobre sus efectos observados en la vía Wnt/ β -catenina, utilizamos inhibidores farmacológicos de PKA (Rp-cAMPS) y PKC (Calfostina C). El tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP aumentó la actividad *TOPflash* en las células MC3T3-E1 a 24 h. Este incremento fue más acusado con la PTHrP (1-36), incluso en presencia de AG en el medio de incubación, aunque no alcanzó los niveles observados con forskolina –un activador de PKA– en las células MC3T3-E1. De acuerdo a lo esperado, los inhibidores Rp-cAMPS y calfofostina C inhibieron este efecto estimulador de la PTHrP (1-36) y la PTHrP (107-139), respectivamente, en estas células osteoblásticas (Fig.29).

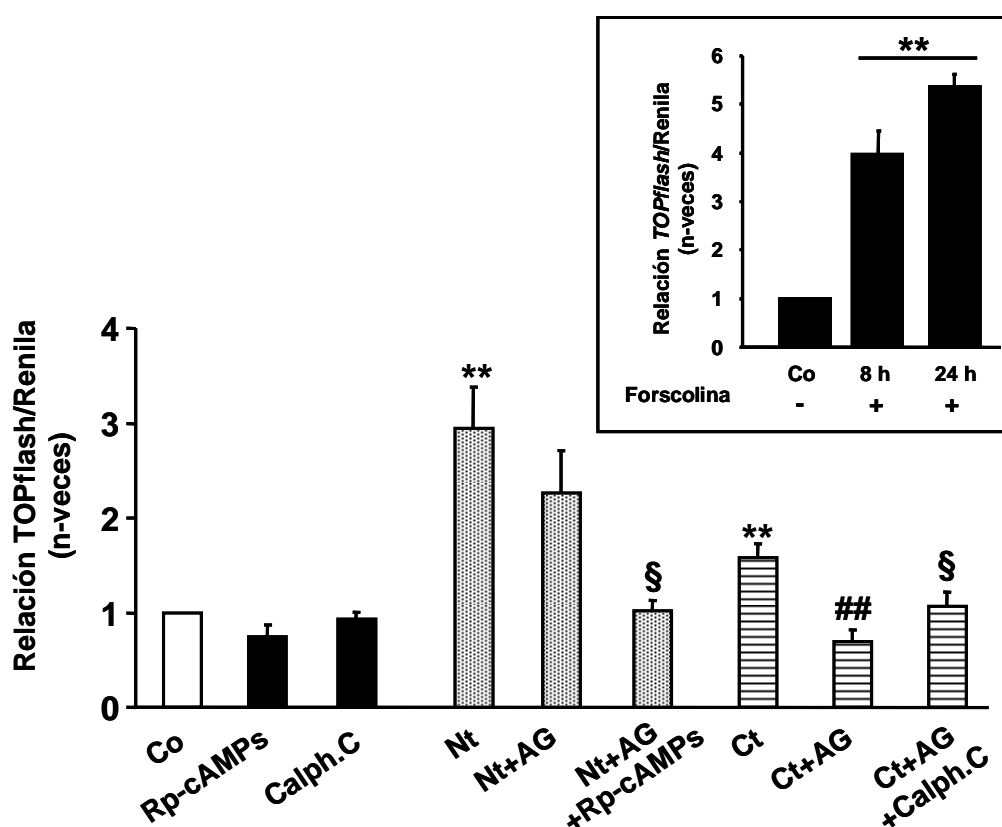


Fig.29. Efecto de ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP sobre la actividad transcripcional de β -catenina en células MC3T3-E1. Las células fueron co-transfectadas con un plásmido reportero *TOPflash*-TCF y un plásmido de renila como normalizador. Actividad TCF (transcripción mediada por β -catenina) en células MC3T3-E1 tratadas con forskolina (100 μ M) durante 8 y 24 h (Inserto) o en estas células estimuladas o no (control, Co) con PTHrP (1-36) (Nt) o PTHrP (107-139) (Ct) (100 nM) durante 24 h, en presencia o ausencia de AG (25 mM). Los inhibidores Rp-cAMPS (10 μ M) y calfofostina C (200 mM) (Calph.C) se añadieron 2 h previas al estímulo. Las barras corresponden a la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes por triplicado. *p<0,05; **p<0,01 vs Co; §p<0,05 vs Nt ó Ct; ##p<0,01 vs Ct.

En un intento de asociar estos efectos de la PTHrP sobre la vía Wnt con sus acciones osteogénicas, analizamos la actividad de FA en células mesenquimales C3H10T1/2 diferenciadas en un medio osteogénico, en presencia o no de AG y de ambos fragmentos de la PTHrP. Observamos que la actividad de FA aumentada por WNT3a exógeno se inhibió por la AG, y dicha inhibición fue revertida por la PTHrP (Fig.30).

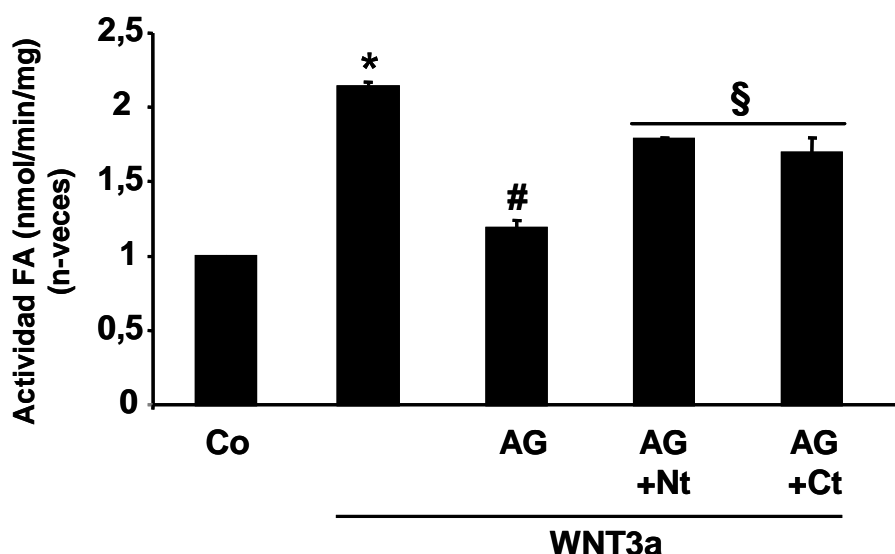


Fig.30. Efecto de WNT3a y de ambos fragmentos de la PTHrP sobre la actividad de FA en células C3H10T1/2 expuestas a AG. Las células fueron mantenidas o no (control, Co) durante 72 h en condiciones de glucosa normal o AG (25 mM) en medio de diferenciación osteogénica. Según la condición experimental, el medio de cultivo fue suplementado con WNT3a exógena y ambos fragmentos de la PTHrP, 1-36 (Nt) o 107-139 (Ct) (100 nM). Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes por duplicado. * $p < 0,05$ vs Co; # $p < 0,05$ vs WNT3a; § $p < 0,05$ vs AG-WNT3a.

4.4. Modelo de osteopenia asociada a DM1 en ratón. Acciones osteogénicas de la PTHrP

Los ratones diabéticos por inyección de STZ mostraron y una disminución significativa del peso corporal respecto a los controles, en parte recuperada por el tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP (Fig.31A-B).

En estos animales, la DM indujo una disminución de la DMO y CMO, así como del porcentaje de grasa periósea, predominantemente en los huesos largos; alteraciones que fueron compensadas por ambos fragmentos de la PTHrP (Tabla VI).

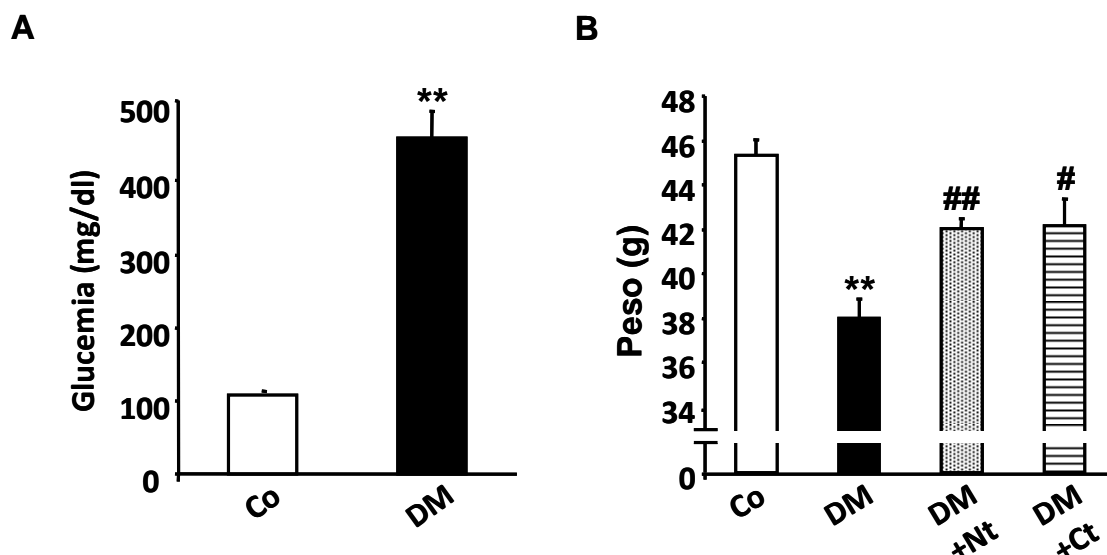


Fig.31. Caracterización del modelo murino de DM1. (A) Glucemia basal en los ratones control (Co) y diabéticos (DM). (B) Cambios en el peso en cada uno de los grupos experimentales: Co, DM, DM tratado con PTHrP (1-36) (DM+Nt) o con PTHrP (107-139) (DM+Ct). Los resultados representan la media \pm EEM de 5 ratones/grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Co; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs DM.

Tabla VI. Valores de masa ósea y grasa periósea en los huesos largos, columna vertebral y cuerpo total de ratones controles y diabéticos, tratados o no con PTHrP (1-36) ó PTHrP (107-139).

		Control	Diabético (DM)	DM + PTHrP (1-36)	DM+PTHrP (107-139)
Fémur	DMO	0,123 \pm 0,001	0,103 \pm 0,0009**	0,106 \pm 0,001	0,119 \pm 0,001##
	CMO	0,046 \pm 0,001	0,041 \pm 0,0005**	0,042 \pm 0,0007	0,047 \pm 0,001#
	%grasa	19,45 \pm 2,376	11,56 \pm 0,409**	17,76 \pm 0,248##	13,34 \pm 0,441#
Tibia	DMO	0,084 \pm 0,002	0,076 \pm 0,0004**	0,086 \pm 0,002#	0,086 \pm 0,002##
	CMO	0,046 \pm 0,001	0,042 \pm 0,0007*	0,045 \pm 0,001#	0,046 \pm 0,0004##
	%grasa	18,94 \pm 0,909	14,98 \pm 0,485**	16,78 \pm 0,171##	18,64 \pm 0,930##
Columna	DMO	0,077 \pm 0,003	0,074 \pm 0,001	0,074 \pm 0,0009	0,076 \pm 0,0007
	CMO	0,092 \pm 0,006	0,057 \pm 0,011*	0,089 \pm 0,001#	0,094 \pm 0,003#
	%grasa	11,96 \pm 0,609	11,06 \pm 0,175	10,4 \pm 0,175#	11,21 \pm 0,606
Cuerpo total	DMO	0,064 \pm 0,001	0,056 \pm 0,001**	0,067 \pm 0,001##	0,067 \pm 0,002##
	CMO	0,901 \pm 0,029	0,864 \pm 0,017	0,892 \pm 0,019	0,892 \pm 0,001
	%grasa	18,78 \pm 1,084	12,82 \pm 0,582**	13,56 \pm 0,597	12,92 \pm 2,143

DMO, densidad mineral ósea (g/cm^2); CMO, contenido mineral óseo (g). Los valores son la media \pm EEM de 5 animales por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs DM.

Mediante histomorfometría realizada en las vértebras (L1-L5), observamos que los ratones diabéticos mostraban una disminución del volumen trabecular total (BV/TV), del grosor medio (Tb.Th) y del número de trabéculas (Tb.N.) y un incremento de separación trabecular (Tb.S); parámetros que se normalizaron tras el tratamiento con los péptidos de la PTHrP (Tabla VII). La tinción de von Kossa permitió visualizar

claramente estas alteraciones en el hueso trabecular de las vértebras en cada uno de los grupos experimentales estudiados (Fig.32).

Tabla VII. Alteraciones de parámetros histomorfométricos en el hueso trabecular (vértebras L1-L5) de ratones diabéticos, tratados o no con PTHrP

	Control	Diabético (DM)	DM + PTHrP (1-36)	DM+PTHrP (107-139)
BV/TV (%)	36,93 ± 1,64	22,21 ± 1,6**	37,19 ± 2,76##	37,43 ± 3,7##
Tb.Th. (μm)	85,49 ± 4,53	59,91 ± 2,24**	83,93 ± 4,81##	88,24 ± 2,91##
Tb.N. (mm⁻¹)	2,26 ± 0,09	1,77 ± 0,09*	2,32 ± 0,07##	2,30 ± 0,15#
Tb. S. (μm)	146,93 ± 9,71	225,97 ± 12,07**	130,12 ± 1,45##	130,52 ± 12,49#

BV/TV, volumen trabecular total; Tb.Th. grosor medio de las trabéculas; Tb.N., número de trabéculas; Tb.S., separación trabecular. Los valores corresponden a la media ± EEM de 5 ratones por grupo. *p<0,05, **p<0,01 vs Co; #p<0,05, ##p<0,01 vs DM.

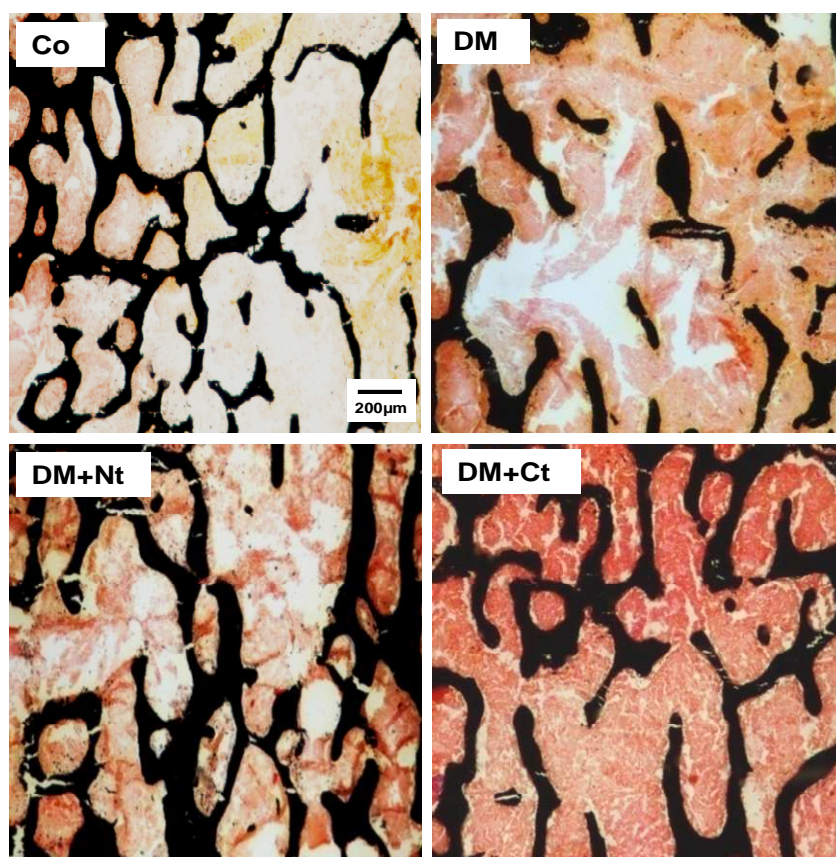
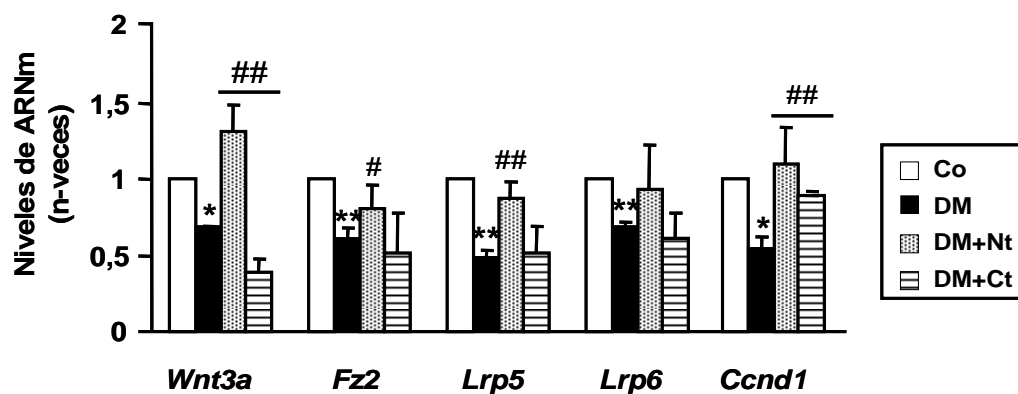


Fig.32. Alteraciones del hueso trabecular en las vértebras (L1-L5) en ratones diabéticos, con o sin tratamiento con PTHrP. Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía óptica (4x) de cortes histológicos de vértebras incluidas en metacrilato teñidos con tinción de Von Kossa, mostrando la estructura trabecular.

Teniendo en cuenta los efectos de la AG sobre la vía Wnt/ β -catenina observados *in vitro*, analizamos la expresión de genes implicados en esta vía en el fémur (sin médula ósea) de los ratones diabéticos, tratados o no con PTHrP. Observamos que la expresión génica de *Wnt3a*, del receptor *Fz2* y de los co-receptores *Lrp5* y *Lrp6* estaba disminuída en estos ratones. El tratamiento con el fragmento N-terminal de la PTHrP, pero no el fragmento C-terminal, revirtió estos efectos negativos en los ratones diabéticos. Sin embargo, ambos fragmentos compensaron la disminución de expresión de *Ccnd1* (diana final de la vía Wnt/ β -catenina) en estos ratones (Fig.33A). Además, en los osteoprogenitores de la médula ósea (CMMOs) de los huesos largos encontramos una menor expresión proteica de β -catenina inducida por la AG, que fue normalizada por ambos péptidos de la PTHrP (Fig.33B).

A



B

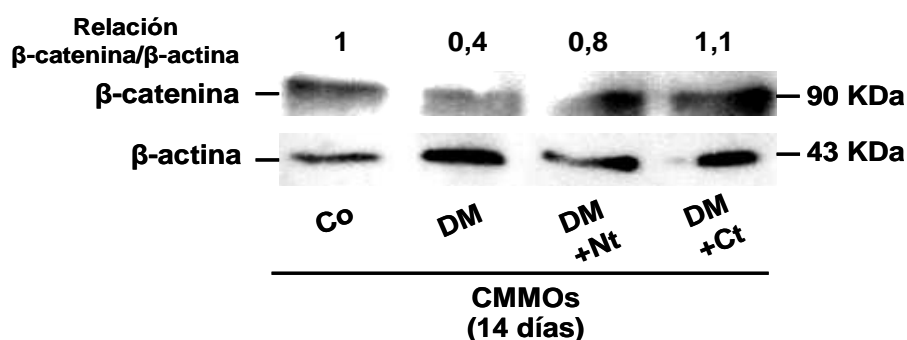


Fig.33. Efecto de la PTHrP sobre la vía Wnt/ β -catenina en los huesos largos de ratones diabéticos. (A) Cambios en la expresión (analizada por PCR a tiempo real) de genes relacionados con la vía Wnt canónica en el fémur de los ratones control (Co) y diabéticos (DM) tratados o no con el fragmento N-terminal (Nt) o C-terminal (Ct) de la PTHrP. Los resultados, expresados como media \pm EEM, corresponden a 2 experimentos realizados de manera independiente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs Co; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs DM. (B) Autoradiografía representativa de los cambios en la expresión de β -catenina en CMMOs extraídas del fémur y las tibias de estos ratones, cultivadas durante 14 d en medio osteogénico con cada uno de los péptidos de la PTHrP (100 nM). Se muestran las intensidades relativas de la señal de β -catenina normalizadas con β -actina para cada condición experimental referidas al control en un experimento representativo.

Dado que la DM se encuentra asociada a un incremento de estrés oxidativo, analizamos la producción de proteínas oxidadas en los ratones diabéticos. Estos animales presentaban un aumento de proteínas carboniladas respecto a los controles, que mostró una tendencia a la normalización tras el tratamiento con PTHrP (1-36), pero no con PTHrP (107-139) (Fig.34).

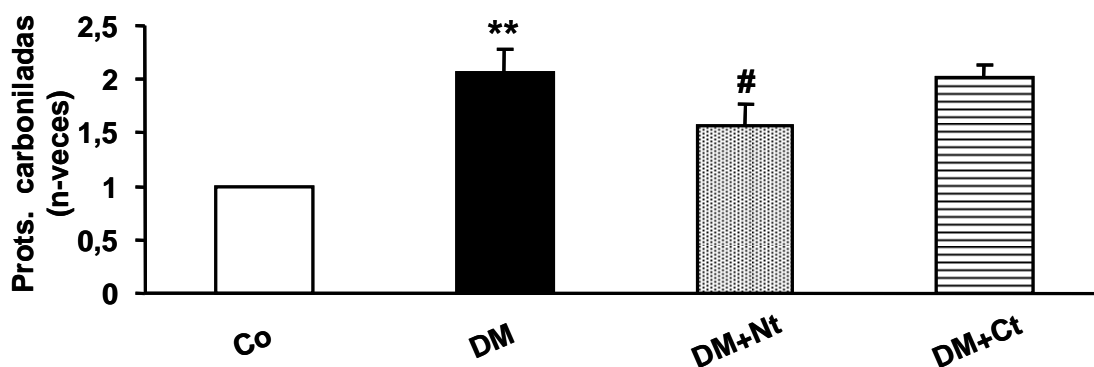


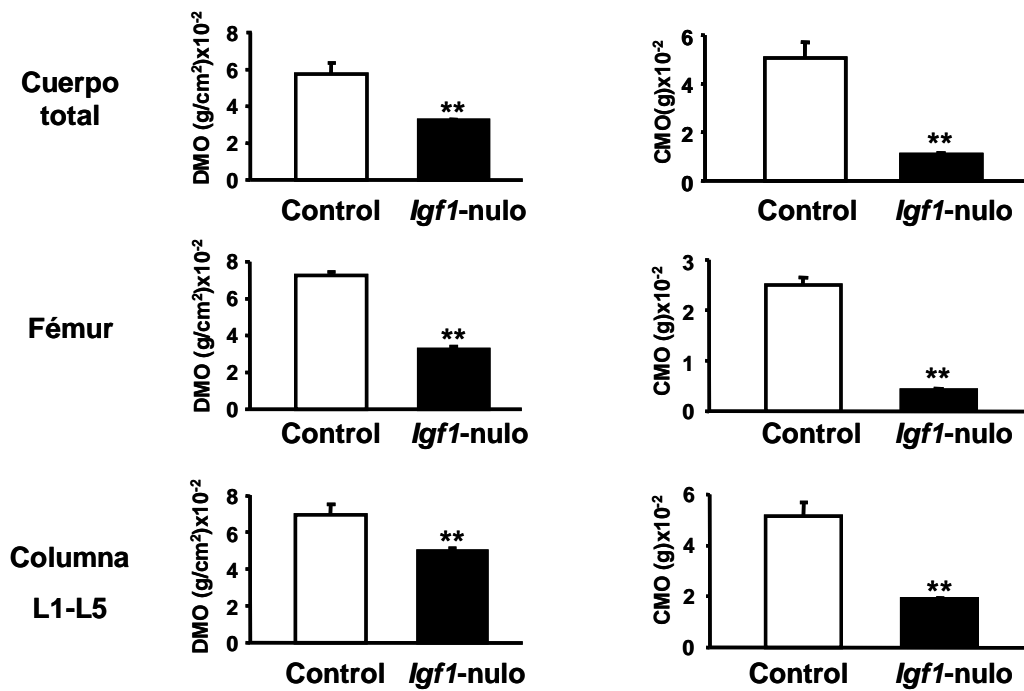
Fig.34. Efecto de la PTHrP sobre la oxidación de proteínas en ratones diabéticos. Medida de las proteínas carboniladas en el fémur de ratones controles y diabéticos, tratados o no con los péptidos de la PTHrP. Los resultados corresponden a la media \pm EEM de los valores obtenidos en los 5 ratones de cada condición experimental. ** $p < 0,01$ vs Co; # $p < 0,05$ vs DM

Estos datos obtenidos en conjunto, tanto *in vitro* como *in vivo*, demuestran que la PTHrP a través de sus dominios N- y C-terminal reestablece, al menos en parte, la activación de la vía Wnt/ β -catenina impedida por la AG.

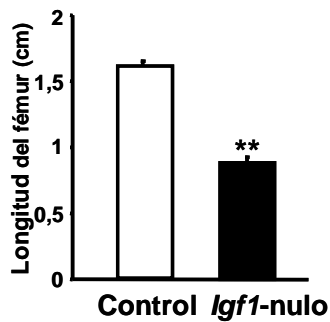
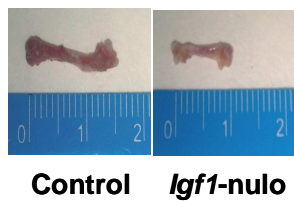
4.5. Alteraciones de la masa y la estructura óseas asociadas al déficit de IGF-I en ratón.

Los ratones *Igf1*-nulos mostraron una disminución significativa del peso, así como de la DMO y CMO respecto a los ratones control en el cuerpo total, fémur y columna (L1-L5) (Fig.35A). Los ratones deficientes en IGF-I presentaban una disminución de la longitud del fémur (Fig. 35B) así como en el espesor de la placa de crecimiento (Fig. 35C) y en el número de trabéculas en la metáfisis tibial respecto a los controles (Fig. 35C). Además, mediante análisis de μ CT, se observó una alteración general en los parámetros estructurales evaluados en los compartimentos cortical y trabecular del fémur de los ratones *Igf1*-nulos respecto a los controles (Tabla VIII).

A



B



C

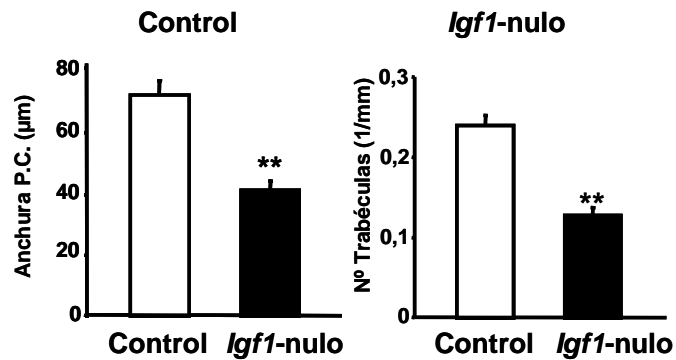
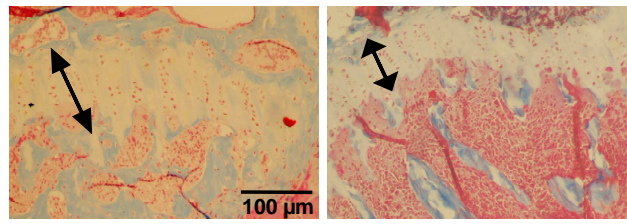


Fig.35. Caracterización de las diferencias fenotípicas del tejido óseo entre ratones control e *Igf1-nulos*. (A) Cuantificación de la DMO y CMO en ratones control e *Igf1-nulos*. (B) Imágenes representativas del tamaño del fémur y medida de su longitud en ambos grupos de ratones. (C) Imágenes representativas de la placa de crecimiento (flechas de doble punta) en cortes histológicos teñidos con tricrómico de Masson en ratones control e *Igf1-nulos*. En la parte inferior, se muestra el análisis cuantitativo de la anchura de la placa de crecimiento (P.C.) (izq.), así como del número de trabéculas en la metáfisis tibial subyacente a la P.C. en ambos genotipos (dcha). Los valores representan las medias \pm EEM de 4-6 animales/grupo experimental. ** $p < 0,01$ vs control.

4.6. Efecto diferencial de los péptidos PTHrP (1-36) y PTHrP (107-111) en la masa y la estructura ósea de ratones normales y deficientes en IGF-I.

Los ratones *Igf1*-nulos mostraron al final del período de estudio (día 14) menos ganancia de masa ósea en el cuerpo total; pero dicha ganancia fue mayor en fémur y en columna, respecto a la de los controles. El tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP produjo un aumento significativo de masa ósea en el cuerpo total y en el fémur de los ratones *Igf1*-nulos (Fig.36A). En éste, la PTHrP aumentó la masa ósea también en los controles (Fig.36A). No se observaron cambios en el peso de los animales inducidos por el tratamiento con los péptidos en ambos genotipos (Fig.36B).

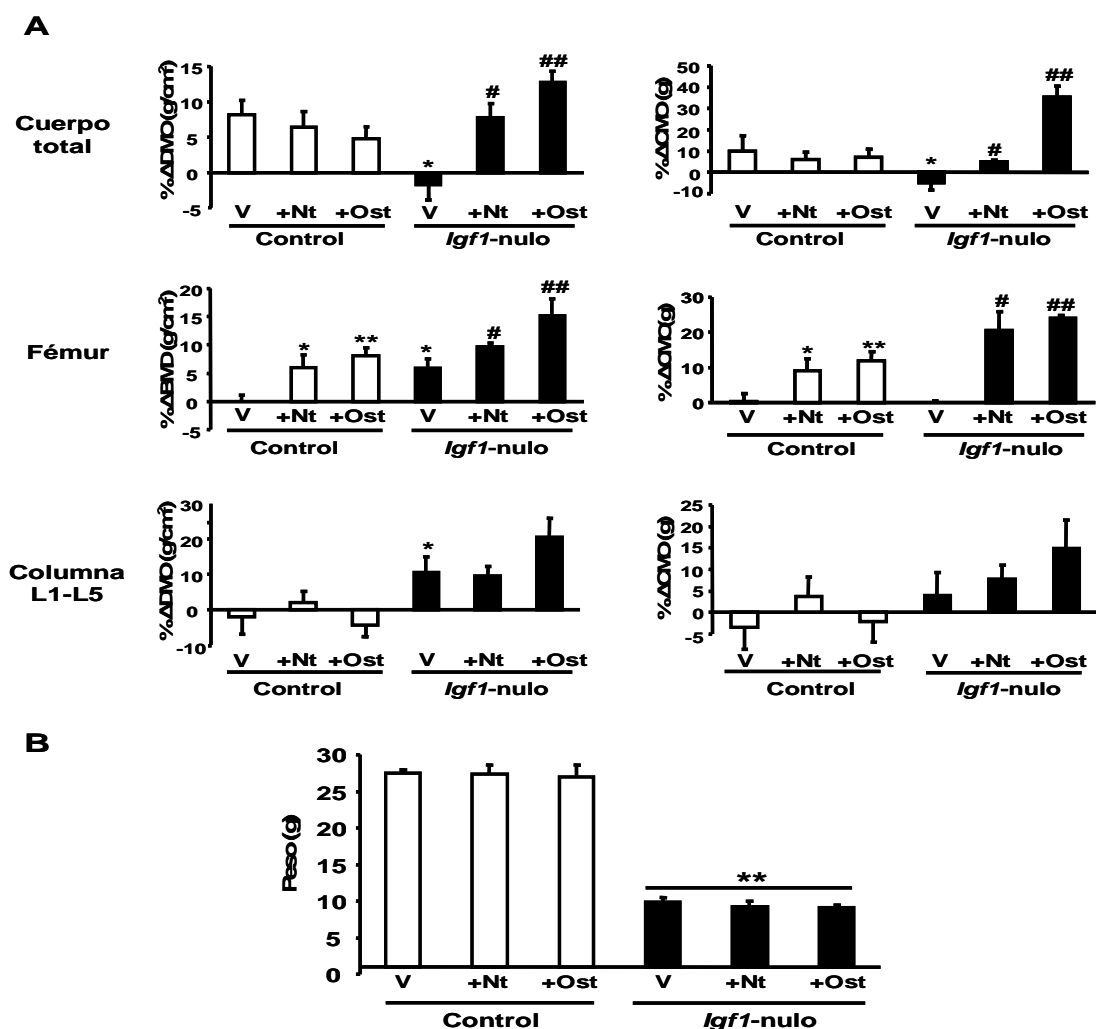


Fig.36. Cambios en la masa ósea y en el peso en ratones control e *Igf1*-nulos tratados o no con los péptidos de la PTHrP. (A) Incrementos (Δ) en % de los valores de DMO y CMO desde el comienzo (día 0) hasta la finalización del estudio (día 14) para cada uno de los genotipos y tras el tratamiento con el fragmento N-terminal de la PTHrP (Nt) o con la osteostatina (Ost). (B) Representación del peso (g) de los ratones de los diferentes grupos experimentales a día 14. Los valores corresponden a las medias \pm EEM de 6-7 ratones para cada condición experimental. $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs V-control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs V-*Igf1*-nulo.

El análisis del fémur distal por μ CT reveló un comportamiento diferencial del tratamiento con los péptidos de la PTHrP, dependiendo del compartimento óseo (cortical o trabecular) en ambos genotipos. Así, en los ratones control, ambos tratamientos estimularon de modo similar los parámetros corticales T.Ar, Ct. Th. y J y el Tb.Th (Tabla VIII) en la metáfisis femoral. Por otro lado, en ratones *lgf1*-nulos, el tratamiento con el fragmento N-terminal de la PTHrP mejoró significativamente todos los parámetros trabeculares evaluados incluso por encima del control, mientras que la osteostatina fue menos eficiente en este compartimento (Tabla VIII). Ninguno de estos péptidos de la PTHrP logró normalizar los parámetros corticales en estos animales deficientes en IGF-I (Tabla VIII).

Tabla VIII. Alteraciones de parámetros histomorfométricos en la metáfisis femoral de ratones control e *lgf1*-nulos, tratados o no con PTHrP.

Hueso trabecular	Control	+Nt	+Ost	<i>lgf1</i> -nulo	<i>lgf1</i> -nulo +Nt	<i>lgf1</i> -nulo +Ost
BV/TV (%)	13,48 \pm 2,40	10,63 \pm 1,01	11,18 \pm 0,91	7,04 \pm 0,87*	15,70 \pm 0,36 [#]	10,82 \pm 0,54 ^{#,b}
BS/TV (mm⁻¹)	7,19 \pm 1,00	5,64 \pm 0,68	6,27 \pm 0,54	4,72 \pm 0,60*	9,13 \pm 0,61 [#]	7,37 \pm 0,47 ^{#,a}
Tb.Th (μm)	50,37 \pm 1,60	56,61 \pm 0,71*	54,92 \pm 0,85*	44,07 \pm 0,70*	52,29 \pm 2,23 [#]	43,47 \pm 1,08 ^b
Tb. N (mm⁻¹)	3,96 \pm 0,30	3,12 \pm 0,42	3,61 \pm 0,38	2,97 \pm 0,37*	4,66 \pm 0,24 [#]	3,68 \pm 0,44
Tb. S. (μm)	238,56 \pm 26,19	290,80 \pm 51,15	269,03 \pm 30,65	321,29 \pm 51,57	238,90 \pm 25,41	261,40 \pm 34,03
Conn.D (mm⁻³)	134,31 \pm 26,70	96,58 \pm 13,66	107,66 \pm 13,94	98,72 \pm 13,52*	266,08 \pm 13,61 [#]	172,03 \pm 19,21 ^{#,b}

Hueso cortical	Control	+Nt	+Ost	<i>lgf1</i> -nulo	<i>lgf1</i> -nulo +Nt	<i>lgf1</i> -nulo +Ost
T. Ar. (mm²)	0,75 \pm 0,01	0,87 \pm 0,03*	0,87 \pm 0,01*	0,28 \pm 0,01*	0,31 \pm 0,03	0,24 \pm 0,01
Ct. Th. (μm)	204,45 \pm 4,28	223,75 \pm 1,42*	222,18 \pm 3,98*	130,07 \pm 6,50*	126,81 \pm 7,72	117,00 \pm 2,72
J (mm⁴)	0,26 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02*	0,34 \pm 0,01*	0,03 \pm 0,01*	0,05 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01

BV/TV, volumen trabecular óseo/volumen total; BS/TV, superficie trabecular/volumen total; Tb. Th, espesor trabecular; Tb.N, número de trabéculas; Tb. S. separación trabecular; Conn.D, conectividad; T.Ar, área total; Ct. Th, espesor cortical; J, momento polar de inercia; Nt, PTHrP (1-36); Ost, osteostatina. Los valores son la media \pm EEM de 6 ratones/grupo. *p<0,05 vs control; [#]p<0,05 vs *lgf1*-nulo; ^ap<0,05; ^bp<0,01 vs *lgf1*-nulo+Nt.

Estas alteraciones en el fémur distal de ambos tipos de ratones, así como las acciones osteogénicas de la PTHrP, se observan claramente en las imágenes de μ CT correspondientes (Fig.37).

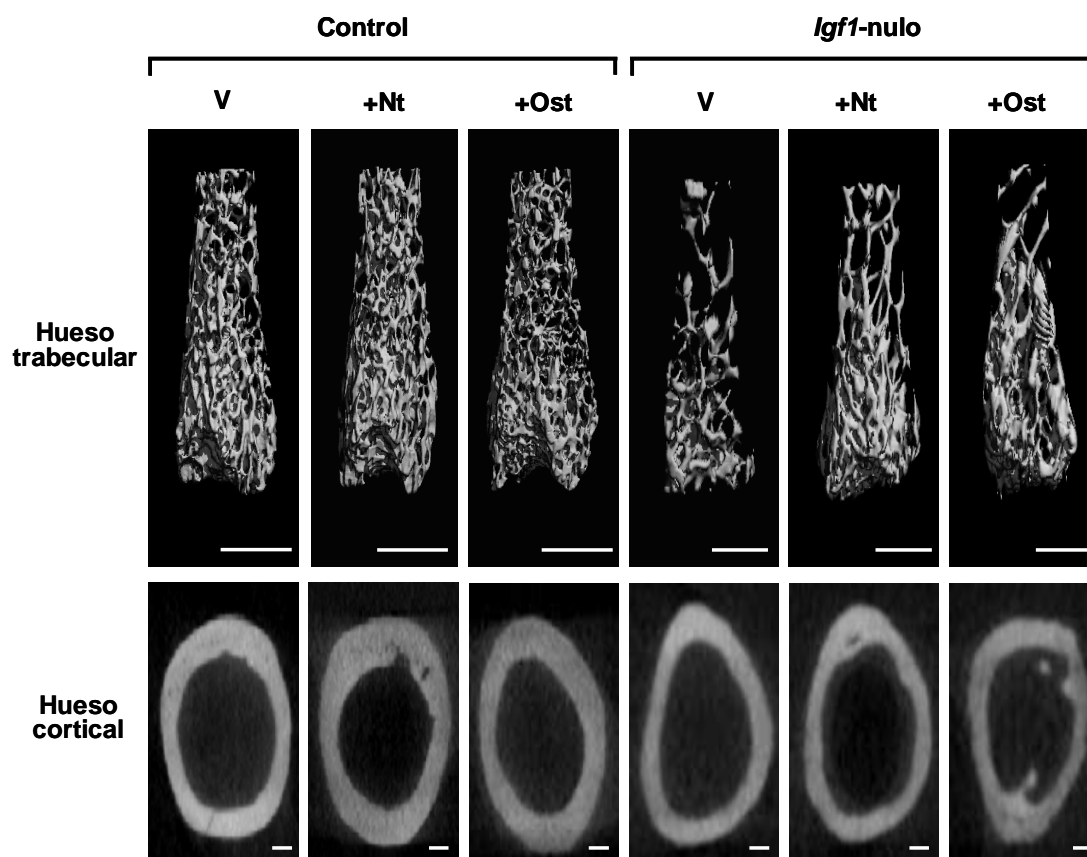


Fig.37. Estructura ósea en ratones control e *Igf1*-nullos, con o sin tratamiento con PTHrP. Imágenes representativas de μ CT del hueso trabecular y cortical del fémur distal en ratones de ambos genotipos, tratados o no con PTHrP (1-36) (Nt) u osteostatina (Ost). Las imágenes fueron ajustadas a una apariencia semejante para facilitar la comparación visual entre ratones control o *Igf1*-nullos, dado que en estos últimos el hueso es significativamente menor. De este modo, la escala del hueso trabecular (fotografías superiores) representa 1 y 0,5 mm, y en el caso del hueso cortical (fotografías inferiores), 200 y 100 μ m, para ratones control e *Igf1*-nullos, respectivamente.

4.7. Efectos comparativos de la PTHrP sobre la expresión de genes óseos en ratones normales y con déficit de IGF-I.

El tratamiento de los controles con ambos péptidos de la PTHrP produjo un incremento similar de la expresión génica de *Runx2* y *Osx* (factores de transcripción clave en la diferenciación temprana de los osteoblastos) en el fémur (Fig.38). En estos ratones, únicamente el tratamiento con osteostatina fue capaz de aumentar el cociente *OPG/RANKL* a expensas del incremento de *OPG* y la disminución de *RANKL* (Fig.38). En cambio, solo el tratamiento con PTHrP (1-36) incrementó la expresión de los genes asociados a la defensa frente al estrés oxidativo, *catalasa* y *Gadd45*. Ninguno de estos

tratamientos afectó a la expresión de *Pthrp*; aunque la de *Pth1r* se incrementó con ambos péptidos de la PTHrP en estos ratones (Fig.38).

Los ratones *Igf1*-nulos presentaron una expresión incrementada de *Runx2*, *Osx* y del cociente *OPG/RANKL*, pero una disminución en la de *catalasa* y *Gadd45*, respecto a los controles (Fig.38). En los animales deficientes en IGF-I, la administración del fragmento N-terminal de la PTHrP disminuyó la expresión de *Osx* relacionado con un incremento de la *Oc* y de los factores de defensa anti-estrés oxidativo. Solo la osteostatina fue capaz de modular el sistema *Pthrp/Pth1r* en estos ratones, disminuyendo la expresión de *Pthrp* e incrementando la de *Pth1r* (Fig.38).

En los ratones *Igf1*-nulos, encontramos una disminución de genes clave en la actividad de la vía canónica de Wnt, *Wnt3a*, *Ccnd1* y *Cx43*, que resultó compensada en parte por el tratamiento con los péptidos de la PTHrP (Fig.39A). El tratamiento con la PTHrP (1-36) incrementó muy por encima del valor basal la expresión de *Cx43* también en los controles. Además, en los ratones *Igf1*-nulos observamos una disminución de esclerostina en la tibia, que resultó compensada parcialmente por la administración de ambos péptidos de la PTHrP (Fig.39B). Esta disminución de esclerostina no se relacionó con cambios en el número de osteocitos en los ratones deficientes en *Igf1*, que tampoco se alteró por el tratamiento con la PTHrP en ambos genotipos estudiados (Fig.39C).

Así mismo, evaluamos los posibles cambios inducidos por el tratamiento con los péptidos de la PTHrP en el número de osteoblastos y osteoclastos en la tibia de los ratones de cada genotipo estudiado. Encontramos que los ratones *Igf1*-nulos presentaron una menor cantidad de ambos tipos celulares por área tisular ósea, en comparación con los controles (Fig.40A-B). En estos ratones, el número de osteoblastos resultó incrementado, mientras que el de osteoclastos disminuyó significativamente, tras la administración de ambos péptidos de la PTHrP; siendo estos efectos mucho más atenuados en los ratones *Igf1*-nulos (Fig.40A-B).

Por otro lado, quisimos comprobar si la PTHrP podría ejercer acciones osteogénicas autónomas a nivel celular en ausencia de IGF-I. Para ello, utilizamos cultivos de CMMOs provenientes de ratones *Igf1*-nulos y controles, tratados *in vitro* con ambos péptidos de la PTHrP. Estos cultivos a partir de ratones *Igf1*-nulos mostraron una menor capacidad de mineralización en comparación con la de los ratones control. Ambos péptidos de la PTHrP aumentaron dicha mineralización, pero sólo en estos últimos ratones (Fig.40C).

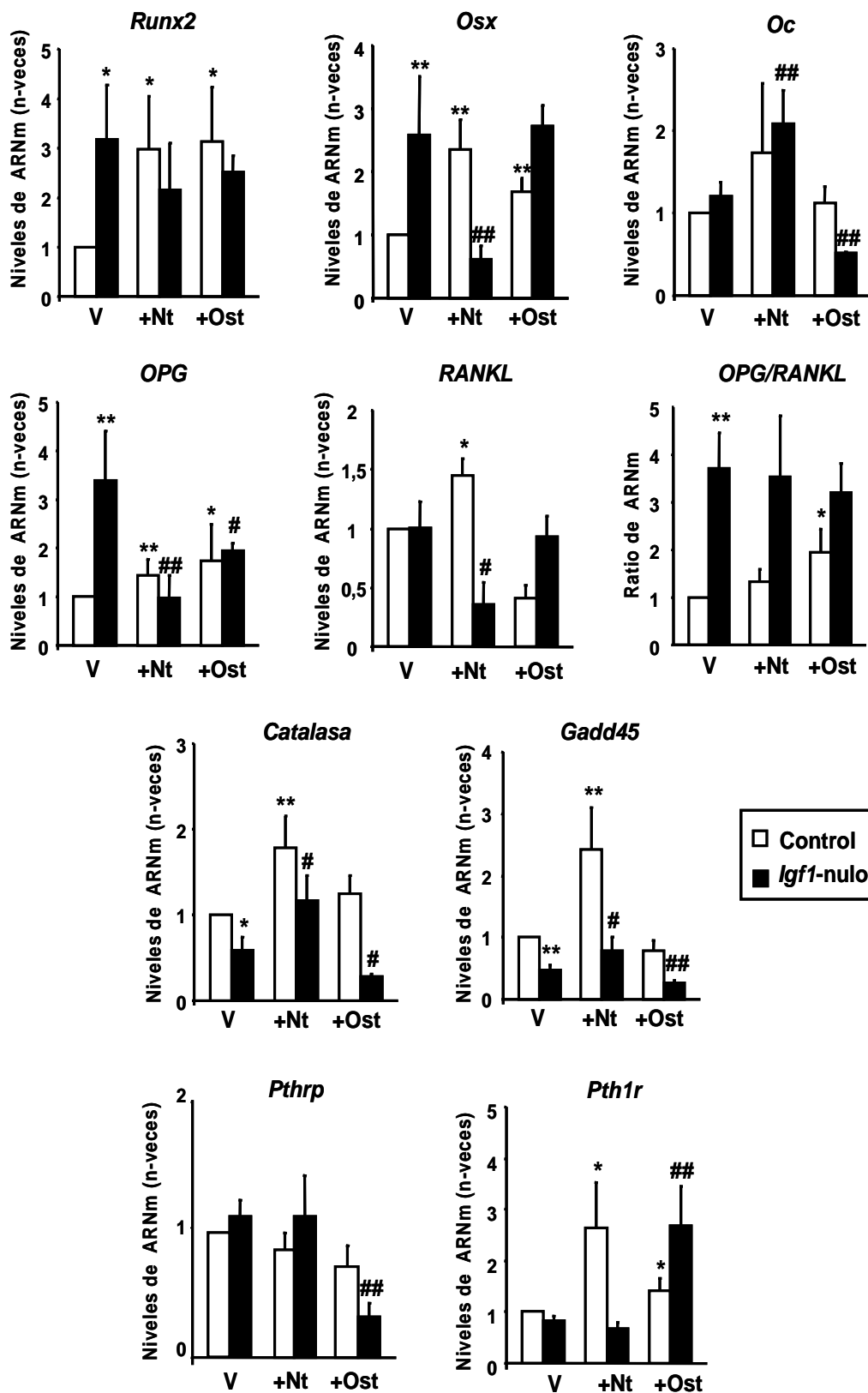


Fig.38. Expresión de genes relacionados con la diferenciación osteoblástica y la defensa frente al estrés oxidativo en ratones control e *Igf1*-nulos tratados o no con la PTHrP. Expresión génica (evaluada por PCR a tiempo real) de *Runx2*, *Osx*, *Oc*, *OPG*, *RANKL*, *catalasa*, *Gadd45*, *Pthrp* y *Pth1r* en el fémur de estos ratones, tratados o no (vehículo, V) con PTHrP (1-36) (Nt) u osteostatina (Ost). Los resultados representan las medias \pm EEM de 6 ratones/grupo experimental. $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs V-control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs V-*Igf1*-nulo.

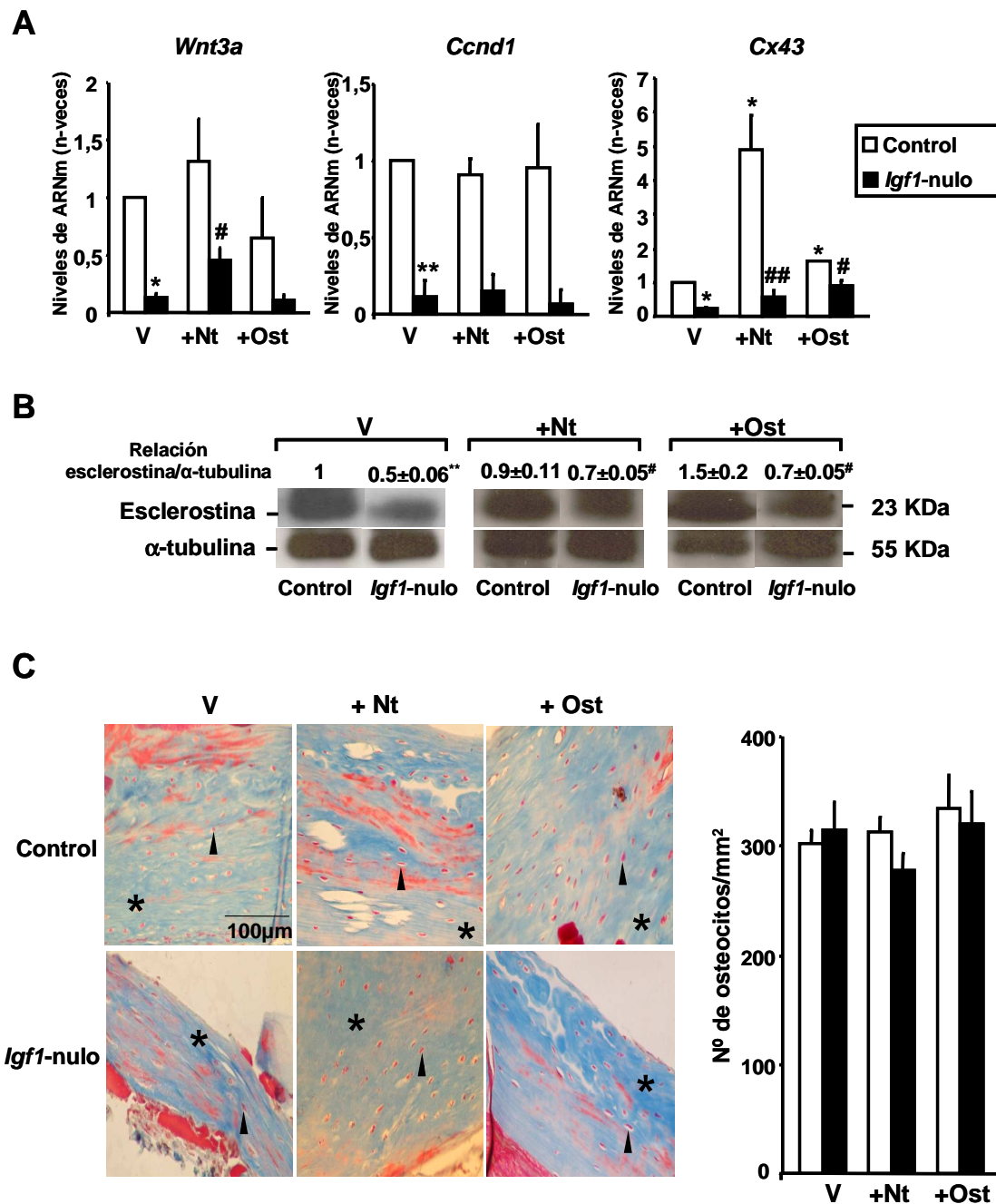


Fig.39. Cambios de factores relacionados con la vía Wnt canónica en ratones control e *Igf1*-nulos tratados o no con la PTHrP. (A) Expresión génica (evaluada por PCR a tiempo real) de *Wnt3a*, *Ccnd1* y *Cx43* en el fémur de estos ratones, tras tratamiento con PTHrP (1-36) (Nt) u osteostatina (Ost) (o vehículo, V). (B) Autoradiogramas representativos de la expresión proteica de esclerostina en la tibia de los diferentes grupos estudiados. Las imágenes provienen de distintos geles. Los valores representan las medias \pm EEM de 6 ratones/grupo. (C) Imágenes representativas (izq.) y cuantificación del número de osteocitos (dcha) en el hueso cortical de la tibia (tinción con tricrómico de Masson) para cada grupo experimental. Los asteriscos y las cabezas de flecha señalan el área de hueso cortical y los osteocitos, respectivamente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs V-control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs V-*Igf1*-nulo.

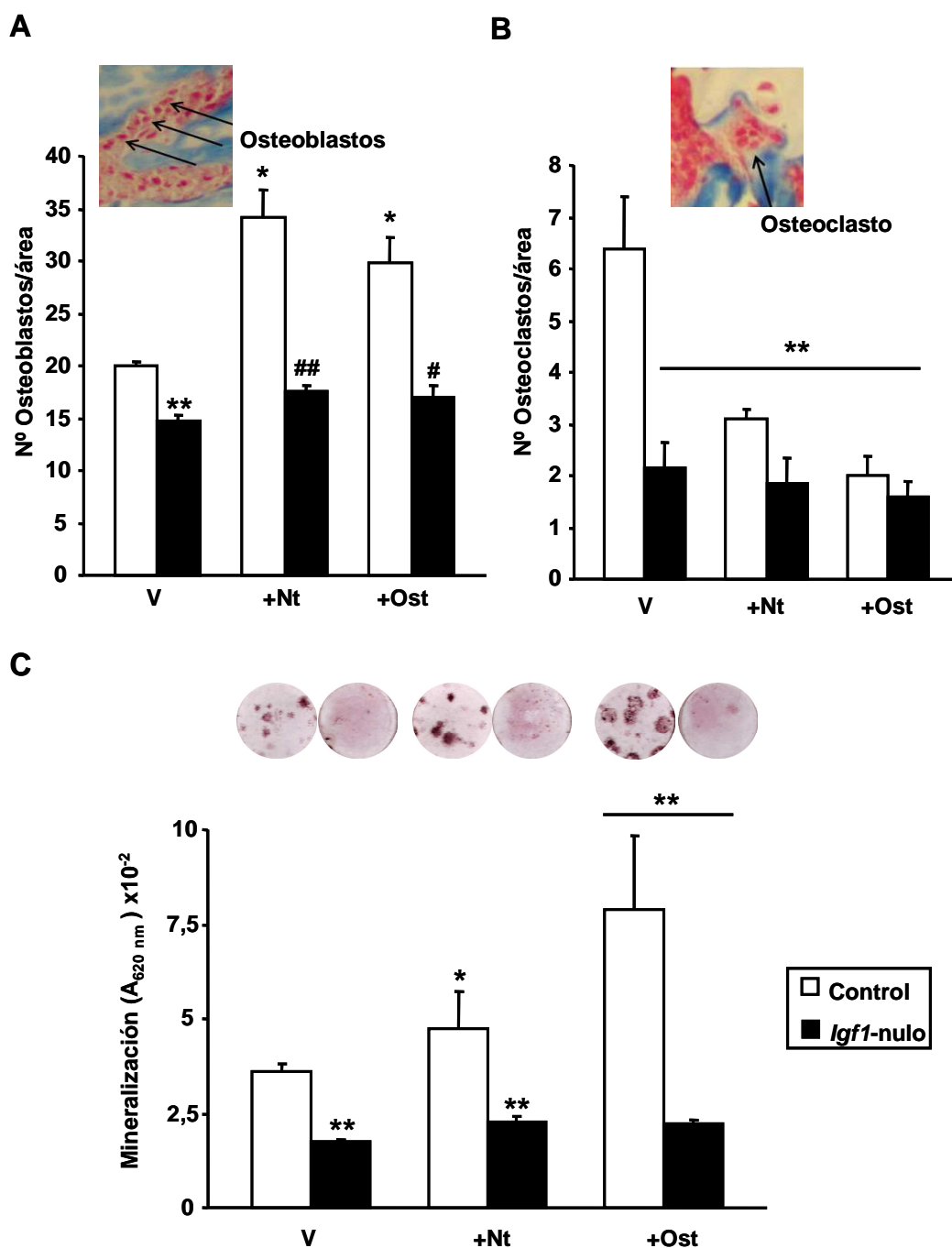


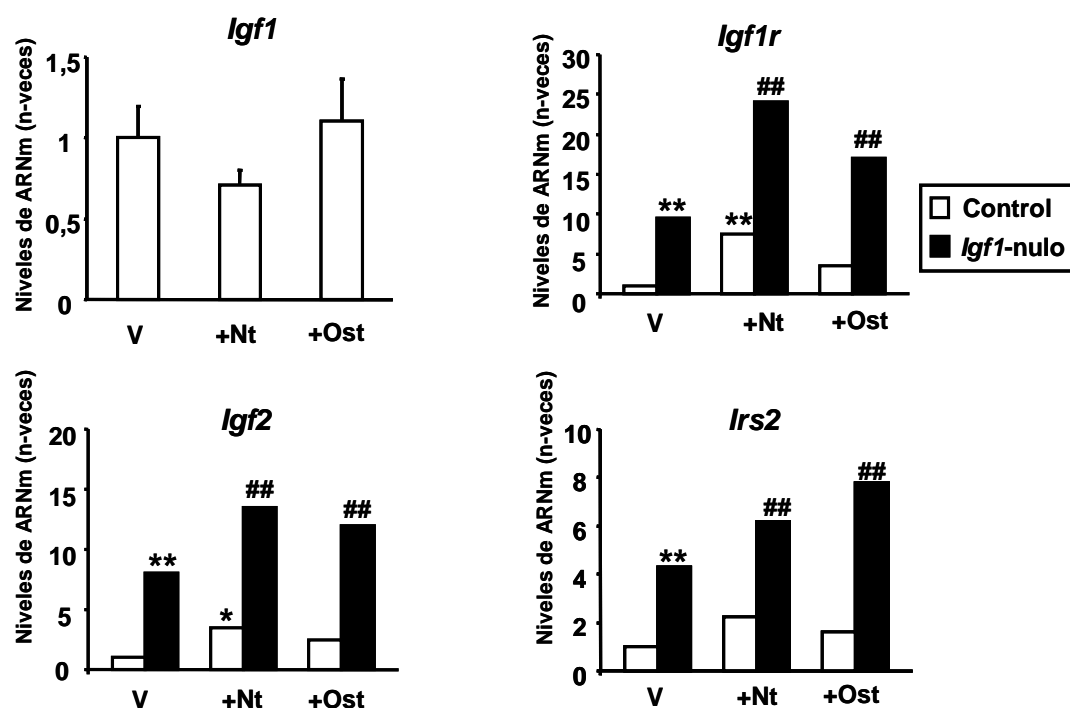
Fig. 40. Efectos de la PTHrP sobre la celularidad ósea en ratones control e *Igf1*-nulos. Se evaluó el nº de osteoblastos (A) y de osteoclastos (B) dispuestos sobre la superficie trabecular en la metáfisis tibial en ratones de ambos genotipos, tratados o no con PTHrP. Insertos: imágenes representativas de osteoblastos (izq.) y osteoclastos (dcha) sobre las trabéculas tibiales en cortes representativos teñidos con Tricrómico de Masson. (C) Las CMMOs de ratones control e *Igf1*-nulos fueron cultivadas durante 16 días, con o sin (vehículo salino, V) PTHrP (1-36) (Nt) u osteostatina (Ost) (100 nM). La mineralización se evaluó mediante tinción con rojo alizarina S. Los valores representan las medias \pm EEM de 7 pocillos de cultivo por condición experimental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs V-control.

4.8. Cambios de expresión ósea de componentes del sistema IGF y su modulación por la PTHrP en ratones control e IGF-I-nulos.

Observamos que la expresión de *Igf1* no resultaba modificada en los ratones control tratados con ambos péptidos de la PTHrP (Fig.41A). Por ello, nos planteamos examinar otros componentes del sistema IGF que podrían verse afectados por la PTHrP para compensar la ausencia de IGF-I. En condiciones basales, encontramos que la expresión génica de *Igf2*, *Igf1r* e *Irs2* estaba aumentada en el fémur de los ratones *Igf1*-nulos en comparación con la de los controles. Además, el tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP incrementó aún más la expresión de estos genes en estos ratones (Fig.41A).

A continuación, nos propusimos investigar el estado de algunas vías de señalización del IGF-IR en los ratones deficientes para *Igf1*, así como el efecto de la administración de la PTHrP. Observamos que el grado de fosforilación de AKT se encontraba disminuído en la tibia de los ratones *Igf1*-nulos respecto a los controles, manteniéndose esta inhibición tras el tratamiento con la PTHrP (Fig.41B). Por otra parte, los niveles de p-ERK, presentaron una tendencia (no significativa estadísticamente) a disminuir en los ratones *Igf1*-nulos respecto a los controles; un efecto compensado por el fragmento N-terminal de la PTHrP (Fig.41B). Mientras que la osteostatina incrementó la expresión de p-ERK solo en los ratones control.

A



B

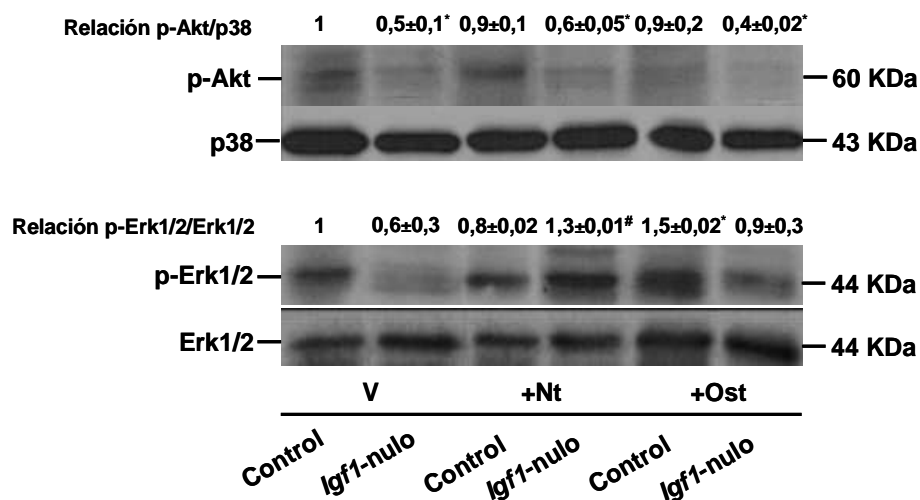


Fig.41. Modulación génica y proteica de factores del sistema IGF por la PTHrP en ratones control e *Igf1*-nulos. (A) Expresión génica (evaluada por RT-PCR) de *Igf1*, *Igf1r*, *Igf2* e *Irs2* en ratones control y deficientes en IGF-I, tratados o no con PTHrP (1-36) ó PTHrP (107-111). (B) Autoradiogramas que representan la expresión de p-Akt y p-Erk1/2 en la tibia de estos ratones. Se muestran las intensidades medias relativas a cada banda referidas al vehículo-control. Las intensidades de Erk1/2 y p38 se emplearon como control de carga en cada caso. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs V-control; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs V-*Igf1*-nulo.

5. DISCUSIÓN

5.1. Papel citoprotector de la autofagia en células osteoblásticas expuestas a AG

Actualmente, existen muy pocos estudios relativos a la importancia de la autofagia en el tejido óseo. La activación de la autofagia ha sido descrita como un importante mecanismo tanto en el desarrollo esquelético [203] como en el mantenimiento del hueso maduro [97, 204]. De hecho, el déficit progresivo de autofagia observado con la edad conlleva la acumulación de proteínas y ácidos nucleicos aberrantes y de ROS pudiendo contribuir a la reducción de la función osteoblástica en la osteopenia involutiva [205, 206]. Recientemente, se ha demostrado la relación existente entre la expresión diferencial de genes reguladores de la autofagia (entre ellos los genes implicados en la codificación de las subunidades catalíticas de AMPK -*Prkka1* y *Prkka2*- y *Atg7*) y la variación de DMO [207].

La condición diabética determina múltiples respuestas a nivel tisular, en parte asociadas a la producción de estrés oxidativo [208]. En el hueso, las hipótesis actuales apuntan al incremento de dicho estrés como uno de los mecanismos subyacentes a la pérdida de masa y/o de la estructura ósea en la DM [209-211]. De hecho, en ratones con DM inducida por estreptozotocina se ha observado que la sobreexpresión del antioxidante tioredoxina-1 disminuye la osteopenia [212].

Los efectos de la AG (como ocurre en el estado diabético) sobre la proliferación y la función osteoblástica han sido estudiados previamente por nuestro grupo y en otros laboratorios. Estos estudios demuestran que el estadio de maduración de los osteoblastos así como la pauta de exposición a la AG son factores relevantes que condicionan sus efectos deletéreos en estas células [170, 213-216]. Los resultados de esta Tesis demuestran que la exposición aguda (48 h) de células osteoblásticas MC3T3-E1 a AG (25 mM) reduce la viabilidad celular, coherente con observaciones previas de nuestro grupo [170]. Por otra parte, se ha demostrado que la exposición crónica de células del linaje osteoblástico a un entorno diabético promueve su desdiferenciación a un fenotipo adipocítico [162, 170, 217-220]. En este contexto, los hallazgos descritos en esta Tesis demuestran que la AG desencadena una respuesta autofágica protectora en las células osteoblásticas, como se ha observado en células β -pancreáticas, cardiomiocitos y células epiteliales en un entorno similar [221, 222]. La manipulación de la autofagia utilizando diferentes procedimientos experimentales nos ha permitido demostrar las consecuencias deletéreas de la supresión del flujo autofágico sobre la viabilidad y función osteoblástica en un entorno diabético representado por la AG. A este respecto, se ha demostrado recientemente que el incremento de autofagia inducido por simvastatina protege a las células osteoblásticas

de la muerte celular mediada por H_2O_2 [223]. Además, la autofagia parece un proceso esencial para iniciar la diferenciación de células mesenquimales de pulpa dentaria humana a osteoblastos, impedida por inhibidores específicos del flujo autofágico [224].

Los mecanismos responsables de la activación de la autofagia en respuesta al estrés oxidativo aún no están completamente dilucidados. La lipidación de LC3 es un proceso crítico en la formación de la membrana de los autofagosomas, de ahí que LC3-II sea ampliamente utilizada como marcador de este proceso en células y tejidos. La proteína ATG4 resulta clave en este proceso ya que interviene en la escisión de pro-LC3 dando lugar a LC3-I, siendo ésta última lipidada y convertida -en un proceso dependiente de ATG7- a LC3-II. Se ha sugerido que la oxidación de un residuo cisteína en el dominio catalítico de ATG4 por ROS constituye un posible mecanismo iniciador de la autofagia en diferentes tejidos [196]. Los resultados de esta Tesis indican que un exceso de producción de ROS activaría la respuesta autofágica en las células osteoblásticas. Una de las posibles causas de dicho exceso en condiciones de AG es el daño mitocondrial, dado que la mitocondria es el principal reservorio de ROS. La AG altera la fosforilación oxidativa dando lugar a la hiperpolarización de la mitocondria, además de inducir estrés de retículo; ambos procesos justificarían la acumulación celular de ROS en esta situación [225, 226]. El acúmulo de ROS conduce a la activación de quinasas tales como la AMPK, p38-MAPK, JNK o ERK, todas ellas implicadas en la respuesta autofágica [114, 225, 227].

El H_2O_2 utilizada como control positivo de ROS en esta Tesis induce autofagia a través de la activación de AMPK, que se ha demostrado ejerce un efecto anti-apoptótico en células osteoblásticas [228]. Observamos que el tratamiento con antioxidantes, NAC y catalasa, revirtió la formación de ROS y el incremento de la mortalidad celular (ambas asociadas al entorno de AG), en concordancia con el papel antioxidante de NAC frente al H_2O_2 descrito en osteoblastos primarios de rata [229]. En esta publicación, concentraciones superiores a las utilizadas en esta Tesis resultaron tener capacidad antioxidante. Sin embargo, la presencia de SBF en el medio de cultivo utilizado en nuestro estudio puede ser un factor que altere el equilibrio redox celular, determinando un efecto coadyuvante del NAC con el del agente inductor de estrés oxidativo, en nuestro caso la AG [230].

En conclusión, los resultados mostrados en esta Tesis evidencian el importante papel de la autofagia como un mecanismo protector de la supervivencia y de la función osteoblástica en situación diabética. Estos datos sugieren a la autofagia como una posible diana terapéutica dirigida a paliar las alteraciones óseas asociadas a la DM.

5.2. Interacción de la AG con la vía Wnt/ β -catenina en células osteoblásticas. Papel modulador de la PTHrP.

La vía de señalización Wnt/ β -catenina actúa como un importante modulador del crecimiento y función osteoblásticas, lo que justifica su interés en la osteopenia/osteoporosis diabética como avalan datos previos [231]. Además, un estudio reciente de nuestro laboratorio demuestra una disminución de la inmunotinción para β -catenina en osteoblastos y osteocitos en la tibia de ratones con DM1 inducida por STZ [176]. En este mismo estudio previo, se encontraron -mediante *PCR arrays*- alteraciones significativas en la expresión de algunos genes relacionados con esta vía [176]. Sin embargo, el patrón observado en estos cambios génicos no permitía concluir el verdadero estado de activación/inhibición de la vía Wnt en este modelo experimental. En la presente Tesis, hemos caracterizado las interacciones de la AG (característica del estado diabético) con los principales componentes de la vía Wnt/ β -catenina en cultivos de células osteoblásticas *in vitro*. Utilizando esta aproximación experimental, hemos demostrado que la AG afecta a diferentes componentes de la vía Wnt canónica e induce la desestabilización de la β -catenina en las células osteoblásticas. Nuestros hallazgos también indican que la PTHrP -a través de sus dominios N- y C-terminal- es capaz de activar esta vía de señalización aun en presencia de AG.

WNT3a es un miembro importante dentro de la familia de proteínas WNT cuya deficiencia homocigótica produce efectos deletéreos en el esqueleto axial del ratón [232]. La expresión de este ligando activador de la vía Wnt/ β -catenina se encuentra relacionada con la diferenciación osteoblástica [233]. Como se ha citado en la Introducción, las proteínas WNT señalizan interaccionando con el complejo formado por el receptor de membrana FZD y los co-receptores LRP5/6 [64]. Así, la disminución observada en la expresión de *Wnt3a* y de ambos co-receptores citados, junto al incremento en la expresión de inhibidores como *Dkk1* y *Axina2*, inducidos por la AG en células osteoblásticas podría contribuir a la inactivación de β -catenina. Nuestros hallazgos demuestran que, a pesar de imprimir la vía Wnt/ β -catenina con WNT3a, el efecto inhibitorio de la AG sobre esta vía de señalización se mantenía en las células osteoblásticas; indicando que la AG afecta a componentes más distales a este ligando. Por otro lado, se ha descrito la activación de p38-MAPK por la AG en estas células [197, 198, 234]. Sin embargo, la interacción entre las vías p38-MAPK y Wnt/ β -catenina parece compleja y mal caracterizada. Por un lado, estudios en líneas celulares no óseas han demostrado que la p38 promueve la estabilización de la β -catenina a través de la fosforilación de los dominios PPPSP de LRP6 o inhibiendo a GSK3 β [235, 236].

Por otro lado, existen evidencias a favor del papel inhibitorio de p38 sobre la vía Wnt (con supresión de la actividad del gen final de la vía Lef1) en células osteoblásticas [237]. Cabe destacar que en estas células, la p38 ejerce una acción activadora sobre *Osx*, un factor inhibitorio de la vía Wnt [238]. Así pues, la evidencia actual sugiere que la inhibición de esta MAPK favorecería la estabilización de β -catenina en las células osteoblásticas. Nuestros resultados utilizando un inhibidor farmacológico de p38 (SB203580) son coherentes con la hipótesis de que la AG activaría p38-MAPK, disminuyendo la actividad transcripcional de β -catenina/TCF en estas células.

Además, encontramos una disminución de p-GSK3 en células osteoblásticas expuestas a condiciones de AG. Como se ha comentado en la Introducción, la GSK3 β es una molécula clave en la modulación de la vía Wnt, en parte a través de su fosforilación por AKT [239]. De este modo, nuestros resultados podrían justificarse por una disminución de AKT en su forma activa por la AG. De hecho, existen evidencias a favor de este mecanismo asociado a la AG: 1) el aumento de PTEN (inhibidor de PI3K/AKT) por la AG en células osteoprogenitoras de rata [240]; los niveles bajos de AKT activa (coincidente con un incremento de p38-MAPK) en pacientes con nefropatía diabética [241]; y 3) la inhibición de los efectos deletéreos de la AG en células osteoblásticas por la hesperidina o el resveratrol a través de la activación de la vía PI3K/AKT [242, 243]. En contraposición con estos hallazgos, se ha descrito que la AG es capaz de activar AKT, promoviendo la diferenciación adipogénica de osteoblastos primarios de rata [244]. Así pues, los efectos de la AG sobre AKT (inhibición o activación) parecen depender del tipo y estadio de diferenciación celular [240]. En la presente Tesis, con objeto de determinar si la acción efectora final de la AG sobre la vía Wnt/ β -catenina recaía en el bloqueo de la fosforilación de GSK3 β empleamos LiCl, que promueve directamente la fosforilación (inactivación) de esta enzima GSK3 β y también activa AKT [245, 246]. Aunque en células mesangiales el LiCl revierte el efecto supresor de la AG sobre la vía Wnt [247], observamos que este tratamiento fue ineficaz para revertir la desestabilización de β -catenina o la inhibición de su actividad transcripcional por la AG en las células osteoblásticas. Así pues, la AG parece afectar negativamente a la vía Wnt/ β -catenina posteriormente a la activación de GSK3 β , posiblemente promoviendo la degradación de β -catenina en estas células. De hecho, la AG no disminuyó la actividad transcripcional TCF característica de la activación de la vía Wnt en células osteoblásticas que sobreexpresan una β -catenina mutada no degradable.

Una posible vía de actuación de la AG en las células óseas es a través de la elevación del estrés oxidativo, que induce la activación de p38-MAPK [248], así como la de FoxO [249, 250]. Los factores de transcripción de la familia FoxO ejercen

diferentes funciones entre las que se encuentra la defensa frente al estrés oxidativo. En el hueso, se expresan FoxO1, 3 y 4 que, en presencia de ROS, son fosforilados por enzimas como JNK quinasa, MST1 y p38-MAPK induciendo su translocación al núcleo [251-253]. En éste, la formación del complejo FoxO/ β -catenina desvía a ésta última de su unión a TCF (impidiendo su acción osteogénica) y favorece su interacción con secuencias concretas de promotores de genes relacionados con el ciclo celular (*p21*, *p27*, *CiclinaG2*), enzimas de defensa frente a ROS (*catalasa*, *SOD*), la reparación de ADN (*Gadd45*) y la apoptosis (*Bim1*, *FasL*) [254]. Los datos obtenidos en esta Tesis apoyan la hipótesis de que el estrés oxidativo inducido por AG, a través de la activación de FoxO, contribuiría a la disminución de actividad de la β -catenina en células osteoblásticas.

Considerando el importante papel de la vía Wnt canónica, como modulador de la proliferación y función osteoblástica, presenta interés su estudio como posible diana terapéutica de agentes osteogénicos. En esta Tesis, hemos demostrado que ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP son capaces de activar la vía Wnt y estabilizar a la β -catenina en un entorno de AG. Los datos obtenidos *in vitro* no permiten descartar que la PTHrP también pudiera interaccionar con inhibidores endógenos de la vía Wnt canónica, como DKK1 y *Sost*/esclerostina, para promover su activación en osteoblastos expuestos a AG. De hecho, se ha demostrado previamente que la PTHrP, de modo similar a la PTH, disminuye la expresión basal de ambos inhibidores en células de osteosarcoma de rata (UMR-106) [255, 256]. Aunque se ha demostrado expresión de *Dkk1* en ciertos clones celulares de MC3T3-E1 [257], en el presente trabajo no hemos podido detectar dicha expresión con sondas TaqMan MGB (Applied Biosystems) o cebadores específicos del gen *Dkk1* de ratón en la cepa utilizada de esta línea celular. Por ello, resulta improbable que la estabilización de la β -catenina inducida por la PTHrP en nuestro estudio se deba a una disminución de la expresión de DKK1. Estudios recientes también indican que la activación del PTH1R puede desencadenar la estabilización de la β -catenina de manera independiente a la señalización por proteínas Wnt, bien mediante el reclutamiento de Dvl y la activación de la PKA [258], o bien por la formación de un complejo con LRP6 (que es rápidamente fosforilado) y la axina (inhibidor de la vía Wnt) [259]. Cualquiera de ambos mecanismos podría contribuir a la estabilización de la β -catenina por la PTHrP (1-36), que interacciona con el PTH1R con la misma afinidad que la PTH en células osteoblásticas [148]. De hecho, en la presente Tesis encontramos que la PTH (1-34) resultó tan eficaz como la PTHrP (1-36) para estimular la expresión de genes diana de la β -catenina en las células MC3T3-E1 expuestas a AG. Por otro lado, este efecto estimulador inducido por la PTHrP (107-139) se observó incluso a dosis inferiores al

rango de nM en estas células; de acuerdo a la estimulación previamente observada en otro gen (OPG) controlado por β -catenina [162].

Nuestros resultados sugieren que la PKA y la PKC actúan como mediadores del efecto estimulador de la PTHrP (1-36) y de la PTHrP (107-139), respectivamente, sobre la activación de la β -catenina en las células osteoblásticas. El papel del sistema AMPc/PKA en esta acción de la PTHrP (1-36) es coherente con datos previos en otra línea celular osteoblástica utilizando la PTH como agonista [256]. Por otro lado, AMPc/PKA y PKC han demostrado ser mediadores importantes de diversas acciones osteoblásticas de la PTHrP (1-36) y la PTHrP (107-139), respectivamente [164, 167, 260].

5.3. Acciones osteogénicas de la PTHrP asociadas a la interacción con componentes de la vía Wnt canónica en el modelo murino de DM1.

En nuestro modelo de ratón con DM1, observamos una pérdida de peso en los ratones diabéticos al final del estudio, que podría estar relacionada con las acciones lipolítica [261] y sarcopénica de la STZ descritas [262]. Utilizando DEXA, corroboramos este hallazgo con el descenso observado en el % de grasa periósea en el cuerpo total y los huesos largos de los ratones diabéticos. En dichas localizaciones, observamos además una disminución de la masa ósea a las 4 semanas de DM. El tratamiento con los péptidos de la PTHrP compensó esta osteopenia, de acuerdo a observaciones anteriores en este modelo de DM1, tanto por otros investigadores tras la administración de otros análogos de PTH [218, 263], como en nuestro laboratorio utilizando ambos fragmentos de PTHrP [162, 170]. En la presente Tesis, hemos ampliado estos hallazgos previos mediante análisis histomorfométrico de las vértebras L1-L5 de los ratones en este modelo de DM1. Encontramos una disminución del BV/TV y de otros parámetros estructurales (Tb. Th. y Tb. N.) en el hueso trabecular vertebral de los ratones diabéticos; coherente con observaciones de otros investigadores en el mismo modelo murino de DM1 [264]. Además, el tratamiento con los péptidos de la PTHrP normalizó estas alteraciones en las vértebras.

En un análisis histomorfométrico reciente en biopsias de cresta ilíaca -un hueso de composición mayoritariamente trabecular utilizado en el diagnóstico de patologías óseas- de pacientes con DM1 no se registraron alteraciones significativas en la estructura trabecular respecto al grupo control sano pero sí una tendencia coherente con los resultados obtenidos en nuestro estudio de los ratones diabéticos [265]. Cabe destacar que las muestras en el estudio citado en pacientes diabéticos fueron

obtenidas antes de que estos pacientes presentaran complicaciones típicas asociadas a la DM.

Datos previos de nuestro grupo en el modelo murino de DM1 inducida por STZ indican una disminución de esclerostina asociada a una mayor tasa de apoptosis osteocítica en la tibia [176]. Los resultados de esta Tesis amplían estos datos y demuestran una alteración en la expresión de genes canónicos de las etapas iniciales de la vía Wnt en el hueso murino diabético, en contraste con lo observado en la rata diabética [231]. En relación a este último trabajo, la tibia de estas ratas diabéticas mostraba una disminución de proteínas implicadas en las etapas iniciales de la vía y una sobreexpresión de *Sost* y *Dkk1* (inhibidores de la vía Wnt canónica) [231]. Niveles elevados de esclerostina y una disminución de β -catenina también se han detectado en el suero de pacientes con DM2 [266]. Así pues, en todos los casos, la DM se asocia a alteraciones coherentes con una disminución de la vía canónica de Wnt.

El estado hiperglucémico asociado a la DM1 condiciona un aumento de la producción de ROS [250, 267], cuya acumulación origina reacciones de oxidación que determinan la carbonilación proteica [190, 268]. De acuerdo a estas observaciones, encontramos un incremento de proteínas carboniladas en el fémur de los ratones diabéticos. Además, tanto las alteraciones observadas en los genes de la vía Wnt canónica como el incremento de proteínas carboniladas se redujeron por el tratamiento con el fragmento N-terminal de la PTHrP. A este respecto, si bien se desconoce el posible efecto de la PTH sobre la oxidación proteica, se ha descrito la capacidad de esta hormona para disminuir la producción de ROS en CMMOs del fémur de ratones viejos, sugiriendo un efecto anti-oxidante mediado por el PTH1R [269]. El exceso de ROS en el hueso diabético afecta a la osteoblastogénesis -derivando la diferenciación de las CMMOs a células de estirpe adipogénica- [270, 271] y a la función osteoblástica -disminuyendo la expresión de *Runx2*, *FA* y *Col1 α* - [272], en parte asociado a la transcripción de *FoxO*, que antagoniza la señalización Wnt canónica [273]. En el presente estudio, encontramos una disminución de β -catenina en los cultivos de CMMOs provenientes de los ratones diabéticos. De hecho, en un modelo de ratón diabético no obeso (de características similares a las del modelo de DM1 por STZ) se ha observado una supresión de la vía PI3K/AKT en células osteoprogenitoras que además de impedir su adhesión y migración podría contribuir a la desestabilización de la β -catenina en estas células [274]. En humanos, estudios recientes han caracterizado una mutación en el gen *Sirt1* directamente relacionada con el desarrollo de una forma familiar de DM1 [275]; esto resulta de interés en el metabolismo óseo ya que SIRT1 es una proteína que promueve la translocación al núcleo de la β -catenina en células osteoprogenitoras [276]. El tratamiento con ambos

péptidos de la PTHrP *in vitro* fue igualmente eficaz para restablecer los niveles de β -catenina en los cultivos de CMMOs de los ratones diabéticos.

Nuestros hallazgos *in vitro* e *in vivo* ponen de manifiesto las acciones deletéreas del estado diabético, disminuyendo la vía Wnt canónica a distintos niveles en células de estirpe osteoblástica. Además, demostramos la capacidad de ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP para contrarrestar, de modo similar aunque no idéntico, los efectos de la AG en estas células, coherente con sus acciones osteogénicas.

5.4. Caracterización del papel del IGF-I en los efectos osteogénicos de los dominios N- y C-terminal de la PTHrP en ratón.

El sistema IGF juega un papel determinante en la regulación del crecimiento somático. Así, los ratones deficientes en IGF-I presentan un acusado retraso en el crecimiento presentando huesos más pequeños que los ratones control [277, 278]. Además, se ha sugerido que una disminución en la producción y/o la actividad de IGF-I contribuye a la pérdida de masa ósea asociada a la edad [279]. Por otra parte, esta disminución parece preservar la solidez de los huesos largos por el menor remodelado óseo observado en ratones viejos [280].

En la presente Tesis, hemos utilizado un modelo de ratón con deficiencia en la expresión del gen *Igf1*, que muestra alteraciones significativas en la masa y en la estructura ósea tanto a nivel trabecular como cortical. Se sabe que el IGF-I incrementa la formación ósea periostal, mientras sus efectos en el hueso trabecular son variables [278, 281, 282]. Estudios previos en otras estirpes de ratones deficientes en este factor han mostrado en los huesos largos una disminución de la formación ósea a nivel cortical, pero un incremento de dicha formación a nivel trabecular [281, 283, 284]. Esta última característica podría ser consecuencia de la incapacidad de los osteoblastos para estimular la osteoclastogénesis en ausencia de IGF-I [284, 285]. De hecho, se ha hipotetizado que el impacto relativo del efecto dual de este factor sobre la osteoblastogénesis y la osteoclastogénesis determinaría las diferencias observadas en distintas localizaciones esqueléticas de los ratones deficientes en IGF-I [281].

Se han descrito también diferencias en las acciones anabólicas de la PTH, administrada de manera intermitente, en el hueso trabecular y cortical en ratones y en humanos [286, 287]. Más recientemente, dichas diferencias también se han observado en mujeres postmenopáusicas tratadas de un modo similar con PTH (1-34) o PTHrP (1-36) [288]. Nuestros hallazgos demuestran que la administración intermitente de

PTHrP (1-36) u osteostatina durante 2 semanas a ratones normales (controles) es similar en eficacia para incrementar la calidad del hueso cortical en la diáfisis femoral, pero no afecta a la mayoría de los parámetros trabeculares metafisarios. Este efecto predominantemente cortical es compatible con lo descrito en ratones con distinto fondo genético tratados con una pauta de PTH (1-34) similar a la de nuestro estudio. La acción anabólica de la PTH en el hueso trabecular de estos ratones parece requerir dosis mayores de la hormona y un tratamiento de mayor duración que los utilizados con PTHrP en el presente trabajo [287, 289, 290]. Ambos péptidos de la PTHrP podrían ejercer un efecto rápido y directo (aún no caracterizado) sobre la diferenciación de células de revestimiento (*lining cells*) a osteoblastos maduros, como se ha descrito para la PTH [291]; dicho efecto justificaría el aumento observado en el número de osteoblastos en la superficie trabecular y de Tb.Th con la PTHrP. Alternativamente, el incremento de este parámetro histomorfométrico en la metáfisis femoral de los ratones control tratados con los péptidos de la PTHrP podría ser consecuencia de su acción anti-resortiva, sugerida por datos previos en otros modelos experimentales [170, 173, 255, 292]. De cualquier modo, estos hallazgos en conjunto indican que las diferentes estirpes de ratones y/o las distintas pautas de administración parecen ser determinantes en las respuestas anabólicas de la PTH y de la PTHrP.

Además, nuestros resultados demuestran el papel clave del IGF-I para los efectos osteogénicos de la PTHrP (1-36) y de la osteostatina en el hueso cortical del ratón. Esto está de acuerdo con otros estudios previos administrando PTH (1-34) -siguiendo la misma pauta de administración empleada en este trabajo con la PTHrP (1-36)- en ratones con deficiencia global de IGF-I o del IGF-IR en osteoblastos [283, 293]. Por otra parte, encontramos que los péptidos de la PTHrP ejercen acciones osteogénicas a nivel trabecular en la metáfisis femoral de los ratones deficientes en IGF-I. En este contexto, resulta igualmente de interés mencionar los efectos anabólicos de la PTH observados en el hueso trabecular de ratones con deficiencia específica del IGF-I proveniente de la síntesis hepática [294]. Como hemos comentado anteriormente, la baja actividad resortiva asociada a la deficiencia del IGF-I, como sugieren nuestros datos del número de osteoclastos y de la expresión génica de OPG/RANKL facilitaría la aparición de una acción anabólica de la PTHrP a este nivel trabecular [281, 283]. A este respecto, estudios previos de nuestro grupo han demostrado los efectos anabólicos de ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP en el hueso trabecular del fémur en ratones diabéticos con un bajo remodelado óseo [162, 170].

Nuestros datos de expresión génica sugieren la existencia de un déficit de maduración osteoblástica -en ausencia de un escenario pro-oxidativo- relacionado con

la osteopenia en los huesos largos de los ratones deficientes en IGF-I. El tratamiento con la PTHrP (1-36) (pero no con osteostatina) incrementó la expresión génica de Oc, sugiriendo su acción correctora de la diferenciación osteoblástica alterada en estos ratones. En relación con este hallazgo, se ha descrito un efecto similar de la PTH para promover la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica (incluida la Oc) en el fémur en otro modelo de ratón deficiente en IGF-I [283]. En este modelo previo, los efectos anabólicos y catabólicos de la PTH sobre el hueso cortical y trabecular, respectivamente, en la tibia de los ratones control no se observaron en los animales con deficiencia de IGF-I. Así pues, parecería que el IGF-I no es esencial para al menos algunos efectos precoces de la PTH en el tejido óseo.

Encontramos, además, que varios componentes de la vía Wnt canónica estaban afectados en los huesos largos de los ratones deficientes en IGF-I, apoyando la existencia de alteraciones en el remodelado óseo de estos animales. La disminución observada en los niveles proteicos de esclerostina en estos ratones indica un deterioro de la función osteocítica, sin afectación del número de osteocitos en el hueso cortical. A este respecto, datos previos en ratones con déficit de IGF-I en osteocitos muestran una marcada deficiencia en el desarrollo óseo y en la respuesta a la estimulación mecánica, asociadas a una activación deficitaria de la vía Wnt [130, 295]. En el presente estudio, hemos encontrado que la administración de PTHrP (1-36) u osteostatina corrige en parte las alteraciones observadas en la vía Wnt canónica en los ratones deficientes en IGF-I. A este respecto, los hallazgos de la presente Tesis discutidos en los apartados anteriores indican que ambos péptidos de la PTHrP también compensan el déficit de activación de esta vía en ratones diabéticos con osteopenia de bajo remodelado, al menos en parte actuando directamente sobre las células de estirpe osteoblástica. Se ha demostrado una disminución de la proliferación de osteoblastos primarios aislados de calota de ratones con déficit parcial de IGF-I [296]. En esta Tesis, encontramos que los huesos largos de los ratones *Igf1*-nulos poseen una disminución del número de osteoblastos trabeculares asociada a la menor capacidad osteogénica de las CMMOs respecto a los ratones control. Un resultado similar se obtuvo en ratones con déficit de *Igf1r* en osteoblastos maduros [293, 297]. Además, las CMMOs de los ratones deficientes en IGF-I mostraron una falta de respuesta a la PTHrP (1-36) y a la osteostatina *in vitro*; en contraste con los ratones control que sí respondieron a PTHrP, como se observó previamente con otro análogo N-terminal de la PTHrP [298]. Estos hallazgos indican la implicación del IGF-I en la acción de la PTHrP sobre células osteoprogenitoras de la médula ósea.

Las células óseas sintetizan IGF-I e IGF-II que actúan por unión al receptor IGF-IR con distinto grado de afinidad [299]. Los humanos con ausencia parcial del gen

IGF1R muestran un retraso en el crecimiento postnatal [300], mientras que los ratones homocigóticos deficientes para este receptor presentan un retraso en la osificación craneal y facial, alteraciones en el oído interno y muerte prematura [126, 301]. Así mismo, mutaciones en la cascada de señalización del IGF-IR (p.e., las que afectan a *lrs*) presentan retraso en el crecimiento y osteopenia asociada a un bajo remodelado óseo [302-304]. Nuestros resultados en ratones con deficiencia en IGF-I demuestran un incremento en la expresión génica de *Igf2*, *Igf1r* y de *Irs2* en el fémur. En estos ratones, observamos una disminución de AKT fosforilada, sin cambios en la activación de ERK, lo que sugiere que la supervivencia celular (mediada por AKT [305]), pero no la proliferación (mediada por ERK, [306]), estaría comprometida en el tejido óseo por la deficiencia de IGF-I. Nuestros datos contrastan con los obtenidos en otros tejidos extraóseos, como la cóclea en el oído interno, la retina o el cerebro, en los que las vías de señalización que promueven la proliferación celular están significativamente inhibidas, permaneciendo activados los mecanismos de estrés [186, 307-309]. Las diferencias del patrón de activación de vías de señalización en el hueso y en otros tejidos en los ratones deficientes en IGF-I sugieren que dicha deficiencia produce alteraciones específicas de tejido [278, 309].

Los niveles de expresión del *Igf1* no se alteraron por el tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP en el fémur de los ratones control. A este respecto, se ha descrito un efecto estimulador de la PTH sobre los niveles óseos de IGF-I (evaluados por radioinmunoensayo), aunque a un mayor tiempo (4 semanas) de tratamiento que el de nuestro protocolo con PTHrP [310, 311]. Sin embargo, observamos un incremento en la expresión de *Igf2*, *Igfr1* e *Irs2* en el fémur, aún más pronunciado en los ratones deficientes en IGF-I, tras el tratamiento con PTHrP. Además, la PTHrP (1-36) promovió la fosforilación de ERK1/2 en estos ratones, sugiriendo que esta vía de señalización podría estar modulada a través del sistema IGF-II/IGF-IR. En cambio, el tratamiento con los péptidos de la PTHrP no normalizó la disminución de p-AKT en estos ratones, indicando su dependencia estricta de IGF-I en el tejido óseo.

Estos hallazgos en conjunto indican que un sistema funcional de IGF es necesario para parte de las acciones osteogénicas de la PTHrP (1-36) y de la osteostatina en el esqueleto murino.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta Tesis, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. La autofagia es un importante mecanismo para preservar la supervivencia y la función osteoblástica en el entorno diabético representado por la AG.
2. Dicho entorno diabético interacciona negativamente con la vía osteogénica de Wnt/ β -catenina a diferentes niveles en los osteoblastos.
3. La deficiencia de IGF-I induce efectos selectivos en el tejido óseo, aparentemente no relacionados con el estrés oxidativo pero asociados a osteopenia.
4. La PTHrP (1-36), (107-139) y (107-111) modulan la vía Wnt canónica en relación a sus acciones osteogénicas en situación diabética y, parcialmente, en ausencia de IGF-I.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Fawcett D. 12^a edición ed. Tratado de Histología - Bloom Fawcett. 1995: Mc Graw Hill- Interamericana. 217-236.
2. Guillén C, Gambini J, Portal-Núñez S, Viña J, y Esbrit P. Osteocalcin: Production, Regulation and Disease. 2012: Nova Biomedical. 119-130.
3. Gonzalez-Macías J y Olmos-Martinez L. Formadores de Hueso. 2005: Scientific communication management.
4. Wurtz T y Berdal A, Osteoblast precursors at different anatomic sites. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2003. 13: 147-61.
5. Van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, y Lowik CW, Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*, 2004. 199: 805-14.
6. Bonewald LF, The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, 2011. 26: 229-38.
7. Boyce BF, Yao Z, y Xing L, Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009. 19: 171-80.
8. Downey PA y Siegel MI, Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*, 2006. 86: 77-91.
9. Karsenty G y Wagner E, Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*, 2002. 389-406.
10. Gerber HP y Ferrara N, Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med*, 2000. 10: 223-8.
11. Kronenberg HM, PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1068: 1-13.
12. Gallagher JC y Sai AJ, Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas*, 2010. 65: 301-7.

13. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, y Schaffler MB, Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res*, 2002. 17: 907-14.
14. Martin TJ y Sims NA, Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*, 2005. 11: 76-81.
15. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, y Karsenty G, Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997. 89: 747-54.
16. Kern B, Shen J, Starbuck M, y Karsenty G, Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem*, 2001. 276: 7101-7.
17. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, y Nakatsuka M, Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, 1999. 274: 6972-8.
18. Newberry EP, Boudreaux JM, y Towler DA, Stimulus-selective inhibition of rat osteocalcin promoter induction and protein-DNA interactions by the homeodomain repressor Msx2. *J Biol Chem*, 1997. 272: 29607-13.
19. Otto F, Lubbert M, y Stock M, Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem*, 2003. 89: 9-18.
20. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, y de Crombrughe B, The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002. 108: 17-29.
21. Zhang C, Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *J Orthop Surg Res*, 2010. 5: 37.
22. Franz-Odenaal TA, Hall BK, y Witten PE, Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*, 2006. 235: 176-90.
23. Kular J, Tickner J, Chim SM, y Xu J, An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*, 2012. 45: 863-73.
24. Jilka RL, Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone*, 2007. 40: 1434-46.

25. Ogita M, Rached MT, Dworakowski E, Bilezikian JP, y Kousteni S, Differentiation and proliferation of periosteal osteoblast progenitors are differentially regulated by estrogens and intermittent parathyroid hormone administration. *Endocrinology*, 2008. 149: 5713-23.
26. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, y Bellido T, Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest*, 1999. 104: 1363-74.
27. Stern PH, Antiresorptive agents and osteoclast apoptosis. *J Cell Biochem*, 2007. 101: 1087-96.
28. Sutton AL, Zhang X, Dowd DR, Kharode YP, Komm BS, y Macdonald PN, Semaphorin 3B is a 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced gene in osteoblasts that promotes osteoclastogenesis and induces osteopenia in mice. *Mol Endocrinol*, 2008. 22: 1370-81.
29. Christakos S, Dhawan P, Porta A, Mady LJ, y Seth T, Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Mol Cell Endocrinol*, 2011. 347: 25-9.
30. Clarke BL y Khosla S, Androgens and bone. *Steroids*, 2009. 74: 296-305.
31. Manolagas SC, Corticosteroids and fractures: a close encounter of the third cell kind. *J Bone Miner Res*, 2000. 15: 1001-5.
32. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, y Khosla S, Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*, 1999. 140: 4382-9.
33. Rubin J, Biskobing DM, Jadhav L, Fan D, Nanes MS, Perkins S, y Fan X, Dexamethasone promotes expression of membrane-bound macrophage colony-stimulating factor in murine osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 1998. 139: 1006-12.

34. Van Staa TP, The pathogenesis, epidemiology and management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 2006. 79: 129-37.
35. Clemens TL y Karsenty G, The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res*, 2011. 26: 677-80.
36. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, y Karsenty G, Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*, 2010. 142: 296-308.
37. Wojcicka A, Bassett JH, y Williams GR, Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1830: 3979-86.
38. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, y Sootweg MC, Growth hormone and bone. *Endocr Rev*, 1998. 19: 55-79.
39. Jones JL y Clemmons DR, Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, 1995. 16: 3-34.
40. Tahimic CG, Wang Y, y Bikle DD, Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013. 4: 6.
41. Miyakoshi N, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, y Mohan S, Evidence that anabolic effects of PTH on bone require IGF-I in growing mice. *Endocrinology*, 2001. 142: 4349-56.
42. Baylink DJ, Finkelman RD, y Mohan S, Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res*, 1993. 8 Suppl 2: S565-72.
43. Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, y Ryoo HM, BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 309: 689-94.
44. Blackwell KA, Raisz LG, y Pilbeam CC, Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab*, 2010. 21: 294-301.
45. Hall BK. Bones and cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology., ed. A. Press. Vol. 23. 2005: Academic Press. 318-327.

46. Miao D, He B, Jiang Y, Kobayashi T, Soroceanu MA, Zhao J, Su H, Tong X, Amizuka N, Gupta A, Genant HK, Kronenberg HM, Goltzman D, y Karaplis AC, Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. *J Clin Invest*, 2005. 115: 2402-11.
47. Moreno JL, Kaczmarek M, Keegan AD, y Tondravi M, IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood*, 2003. 102: 1078-86.
48. Ragab AA, Nalepka JL, Bi Y, y Greenfield EM, Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. 283: C679-87.
49. Cawthorn WP, Bree AJ, Yao Y, Du B, Hemati N, Martinez-Santibanez G, y MacDougald OA, Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a beta-catenin-dependent mechanism. *Bone*, 2012. 50: 477-89.
50. Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, Basdra EK, y Papavassiliou AG, Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med*, 2009. 15: 208-16.
51. Bonewald LF, Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision*, 2006. 3: 7-15.
52. Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, y Burger EH, The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech*, 2001. 34: 671-7.
53. Liu XH, Kirschenbaum A, Weinstein BM, Zaidi M, Yao S, y Levine AC, Prostaglandin E2 modulates components of the Wnt signaling system in bone and prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 394: 715-20.

54. Bonewald LF y Johnson ML, Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, 2008. 42: 606-15.
55. Marie P, Bone remodeling: a social network of cells. *Medicographia*, 2012. 34: 149-154.
56. Verborgt O, Gibson GJ, y Schaffler MB, Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res*, 2000. 15: 60-7.
57. Matsuo K y Irie N, Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 473: 201-9.
58. Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Itabe H, Nakayama KI, Nakayama K, Nakamura K, y Tanaka S, Negative feedback loop in the Bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 2007. 22: 1631-9.
59. Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, y Kim HH, Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *Embo J*, 2006. 25: 5840-51.
60. Nusse R y Varmus HE, Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 1982. 31: 99-109.
61. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, Moon R, y Varmus H, A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*, 1991. 64: 231.
62. Port F y Basler K, Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading. *Traffic*, 2010. 11: 1265-71.
63. Miller JR, The Wnts. *Genome Biol*, 2002. 3: REVIEWS3001.
64. Glass DA, 2nd y Karsenty G, Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Top Dev Biol*, 2006. 73: 43-84.

65. Logan CY y Nusse R, The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. 20: 781-810.
66. Wu CH y Nusse R, Ligand receptor interactions in the Wnt signaling pathway in *Drosophila*. *J Biol Chem*, 2002. 277: 41762-9.
67. Choi HY, Dieckmann M, Herz J, y Niemeier A, Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One*, 2009. 4: e7930.
68. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, y Niehrs C, Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*, 2002. 417: 664-7.
69. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, y He X, Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 2002. 108: 837-47.
70. He X, Semenov M, Tamai K, y Zeng X, LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 2004. 131: 1663-77.
71. Krishnan V, Bryant HU, y Macdougald OA, Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*, 2006. 116: 1202-9.
72. Kim JH, Liu X, Wang J, Chen X, Zhang H, Kim SH, Cui J, Li R, Zhang W, Kong Y, Zhang J, Shui W, Lamplot J, Rogers MR, Zhao C, Wang N, Rajan P, Tomal J, Statz J, Wu N, Luu HH, Haydon RC, y He TC, Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2013. 5: 13-31.
73. Escobar-Gómez J, Jódar E, y Hawkins F, Receptor Wnt: Fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. *REEMO*, 2009. 18: 39-44.
74. MacDonald BT y He X, Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/beta-catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. 4:

75. Kim I, Pan W, Jones SA, Zhang Y, Zhuang X, y Wu D, Clathrin and AP2 are required for PtdIns(4,5)P2-mediated formation of LRP6 signalosomes. *J Cell Biol*, 2013. 200: 419-28.
76. MacDonald BT, Semenov MV, Huang H, y He X, Dissecting molecular differences between Wnt coreceptors LRP5 and LRP6. *PLoS One*, 2011. 6: e23537.
77. Qin Y, Li L, Pan W, y Wu D, Regulation of phosphatidylinositol kinases and metabolism by Wnt3a and Dvl. *J Biol Chem*, 2009. 284: 22544-8.
78. Cselenyi CS, Jernigan KK, Tahinci E, Thorne CA, Lee LA, y Lee E, LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105: 8032-7.
79. Piao S, Lee SH, Kim H, Yum S, Stamos JL, Xu Y, Lee SJ, Lee J, Oh S, Han JK, Park BJ, Weis WI, y Ha NC, Direct inhibition of GSK3beta by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One*, 2008. 3: e4046.
80. Brazil DP, Yang ZZ, y Hemmings BA, Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*, 2004. 29: 233-42.
81. Raucci A, Bellosta P, Grassi R, Basilico C, y Mansukhani A, Osteoblast proliferation or differentiation is regulated by relative strengths of opposing signaling pathways. *J Cell Physiol*, 2008. 215: 442-51.
82. Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec JL, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD, y De Robertis EM, Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, 2010. 143: 1136-48.
83. Metcalfe C y Bienz M, Inhibition of GSK3 by Wnt signalling--two contrasting models. *J Cell Sci*, 2011. 124: 3537-44.
84. Nusse R, Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. 4:

85. Levasseur R, Lacombe D, y de Vernejoul MC, LRP5 mutations in osteoporosis-pseudoglioma syndrome and high-bone-mass disorders. *Joint Bone Spine*, 2005. 72: 207-14.
86. Balemans W, Devogelaer JP, Cleiren E, Piters E, Caussin E, y Van Hul W, Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *J Bone Miner Res*, 2007. 22: 708-16.
87. Riancho JA, Olmos JM, Pineda B, Garcia-Ibarbia C, Perez-Nunez MI, Nan DN, Velasco J, Cano A, Garcia-Perez MA, Zarrabeitia MT, y Gonzalez-Macias J, Wnt receptors, bone mass, and fractures: gene-wide association analysis of LRP5 and LRP6 polymorphisms with replication. *Eur J Endocrinol*, 2011. 164: 123-31.
88. Holmen SL, Giambernardi TA, Zylstra CR, Buckner-Berghuis BD, Resau JH, Hess JF, Glatt V, Bouxsein ML, Ai M, Warman ML, y Williams BO, Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both *Lrp5* and *Lrp6*. *J Bone Miner Res*, 2004. 19: 2033-40.
89. Glass DA, 2nd y Karsenty G, Canonical Wnt signaling in osteoblasts is required for osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1068: 117-30.
90. Baron R y Kneissel M, WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*, 2013. 19: 179-92.
91. De A, Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011. 43: 745-56.
92. Rao TP y Kuhl M, An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res*, 2010. 106: 1798-806.
93. Wongdee K y Charoenphandhu N, Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes*, 2011. 2: 41-8.
94. Inzerillo AM y Epstein S, Osteoporosis and diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*, 2004. 5: 261-8.

95. World Health Organ: Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 1994. 843: 1-129.
96. López-Barbeiro B, *Guía de Consulta rápida: Osteoporosis*. 2011, Barcelona: Temis Medical. 1-32.
97. Manolagas SC y Parfitt AM, What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. 21: 369-74.
98. Martínez ME, del Campo MT, Medina S, Sánchez M, Sánchez-Cabezudo MJ, Esbrit P, Martínez P, Moreno I, Rodrigo A, Garcés MV, y Munuera L, Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcif Tissue Int*, 1999. 64: 280-6.
99. Nogués X y Díez A. Definición y epidemiología de la osteoporosis. 2000, Barcelona: Profármaco 2 editores. 3-6.
100. Andersen TL, Abdelgawad ME, Kristensen HB, Hauge EM, Rolighed L, Bollerslev J, Kjaersgaard-Andersen P, y Delaisse JM, Understanding coupling between bone resorption and formation: are reversal cells the missing link? *Am J Pathol*, 2013. 183: 235-46.
101. Martín-Navarro J, Melero-Martín R, Caramelo C, y Pérez-Villacastín B, Enfermedad ósea adinámica. *REEMO*, 2001. 10: 178-9.
102. Brandi M, *Medicographia*, 2010. 32: 364-9.
103. Thrailkill KM, Lumpkin CK, Jr., Bunn RC, Kemp SF, y Fowlkes JL, Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. 289: E735-45.
104. Vestergaard P, Rejnmark L, y Mosekilde L, Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. *Calcif Tissue Int*, 2009. 84: 45-55.
105. McCabe LR, Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. *J Cell Biochem*, 2007. 102: 1343-57.

106. Rakel A, Sheehy O, Rahme E, y LeLorier J, Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, 2008. 34: 193-205.
107. Starup-Linde J, Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013. 4: 21.
108. de Liefde I, van der Klift M, de Laet CE, van Daele PL, Hofman A, y Pols HA, Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporos Int*, 2005. 16: 1713-20.
109. Kroemer G y Levine B, Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9: 1004-10.
110. González CD, Lee MS, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MI, Watada H, y Wiley JW, The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy*, 2011. 7: 2-11.
111. Klionsky DJ, Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8: 931-7.
112. Jahreiss L, Menzies FM, y Rubinsztein DC, The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic*, 2008. 9: 574-87.
113. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, y Watada H, Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab*, 2008. 8: 325-32.
114. Moruno F, Pérez-Jiménez E, y Knecht E, Regulation of Autophagy by Glucose in Mammalian Cells. *Cells*, 2012. 1: 372-395.
115. Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C, y Paolisso G, Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. 285: E1064-71.

116. Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, y Beyer MM, The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res*, 1988. 6: 317-23.
117. Dixit PK y Ekstrom RA, Decreased breaking strength of diabetic rat bone and its improvement by insulin treatment. *Calcif Tissue Int*, 1980. 32: 195-9.
118. Hou JC, Zernicke RF, y Barnard RJ, Effects of severe diabetes and insulin on the femoral neck of the immature rat. *J Orthop Res*, 1993. 11: 263-71.
119. Verhaeghe J, Suiker AM, Visser WJ, Van Herck E, Van Bree R, y Bouillon R, The effects of systemic insulin, insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone growth and turnover in spontaneously diabetic BB rats. *J Endocrinol*, 1992. 134: 485-92.
120. Goodman WG y Hori MT, Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes*, 1984. 33: 825-31.
121. Follak N, Kloting I, y Merk H, Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*, 2005. 21: 288-96.
122. Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, y Ronnema T, Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999. 22: 1196-200.
123. Thrailkill KM, Insulin-like growth factor-I in diabetes mellitus: its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility. *Diabetes Technol Ther*, 2000. 2: 69-80.
124. Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, y Bohm BO, Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol*, 1998. 159: 297-306.
125. Courtland HW, Sun H, Beth-On M, Wu Y, Elis S, Rosen CJ, y Yakar S, Growth hormone mediates pubertal skeletal development independent of hepatic IGF-1 production. *J Bone Miner Res*, 2011. 26: 761-8.

126. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, y Efstratiadis A, Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 1993. 75: 59-72.
127. Wang Y, Cheng Z, Elalieh HZ, Nakamura E, Nguyen MT, Mackem S, Clemens TL, Bikle DD, y Chang W, IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway. *J Bone Miner Res*, 2010. 26: 1437-46.
128. Govoni KE, Lee SK, Chung YS, Behringer RR, Wergedal JE, Baylink DJ, y Mohan S, Disruption of insulin-like growth factor-I expression in type IIalpha collagen-expressing cells reduces bone length and width in mice. *Physiol Genomics*, 2007. 30: 354-62.
129. Govoni KE, Wergedal JE, Florin L, Angel P, Baylink DJ, y Mohan S, Conditional deletion of insulin-like growth factor-I in collagen type 1alpha2-expressing cells results in postnatal lethality and a dramatic reduction in bone accretion. *Endocrinology*, 2007. 148: 5706-15.
130. Sheng MH, Zhou XD, Bonewald LF, Baylink DJ, y Lau KH, Disruption of the insulin-like growth factor-1 gene in osteocytes impairs developmental bone growth in mice. *Bone*, 2013. 52: 133-44.
131. Bikle D y Wang Y, Insulin-like growth factor-I and bone. *IBMS BoneKEY*, 2011. 8: 328-341.
132. Gennari L, Merlotti D, y Nuti R, Selective estrogen receptor modulator (SERM) for the treatment of osteoporosis in postmenopausal women: focus on lasofoxifene. *Clin Interv Aging*, 2010. 5: 19-29.
133. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, y Christiansen C, Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 2009. 361: 756-65.

134. Duong L, Therapeutic inhibition of cathepsin K-reducing bone resorption while maintaining bone formation. *IBMS BoneKEY*, 2012. 2: 67.
135. Wallis K, Walters JR, y Forbes A, Review article: glucagon-like peptide 2--current applications and future directions. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007. 25: 365-72.
136. Murphy MG, Cerchio K, Stoch SA, Gottesdiener K, Wu M, y Recker R, Effect of L-000845704, an α V β 3 integrin antagonist, on markers of bone turnover and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90: 2022-8.
137. Turgeman G, Zilberman Y, Zhou S, Kelly P, Moutsatsos IK, Kharode YP, Borella LE, Bex FJ, Komm BS, Bodine PV, y Gazit D, Systemically administered rhBMP-2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice. *J Cell Biochem*, 2002. 86: 461-74.
138. Toulis KA, Anastasilakis AD, Polyzos SA, y Makras P, Targeting the osteoblast: approved and experimental anabolic agents for the treatment of osteoporosis. *Hormones (Athens)*, 2011. 10: 174-95.
139. Atkins GJ, Welldon KJ, Halbout P, y Findlay DM, Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporos Int*, 2009. 20: 653-64.
140. Hurtel-Lemaire AS, Mentaverri R, Caudrillier A, Cournarie F, Wattel A, Kamel S, Terwilliger EF, Brown EM, y Brazier M, The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. *J Biol Chem*, 2009. 284: 575-84.
141. Silva BC, Costa AG, Cusano NE, Kousteni S, y Bilezikian JP, Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest*, 2011. 34: 801-10.
142. Vahle JL, Sato M, Long GG, Young JK, Francis PC, Engelhardt JA, Westmore MS, Linda Y, y Nold JB, Skeletal changes in rats given daily subcutaneous

- injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol*, 2002. 30: 312-21.
143. Cusano NE y Bilezikian JP, Combination antiresorptive and osteoanabolic therapy for osteoporosis: we are not there yet. *Curr Med Res Opin*, 2011. 27: 1705-7.
 144. Quemerais-Durieu MA, Kerlan V, y Chabre O, [Therapeutic innovation in osteoporosis (antisclerostin antibody and denosumab)]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2011. 72 Suppl 1: S15-22.
 145. Rossini M, Gatti D, y Adami S, Involvement of WNT/beta-catenin signaling in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 2013. 93: 121-32.
 146. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, y Stewart AF, Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev*, 1996. 76: 127-73.
 147. Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, Warshawsky H, Lipman ML, Matsuki Y, Ejiri S, Tanaka M, Izumi N, Ozawa H, y Goltzman D, Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol*, 1996. 175: 166-76.
 148. Datta NS y Abou-Samra AB, PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal*, 2009. 21: 1245-54.
 149. McCauley LK y Martin TJ, Twenty-five years of PTHrP progress: from cancer hormone to multifunctional cytokine. *J Bone Miner Res*, 2012. 27: 1231-9.
 150. Juppner H, Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1994. 3: 371-8.
 151. Longo A, Librizzi M, Naselli F, Caradonna F, Tobiasch E, y Luparello C, PTHrP in differentiating human mesenchymal stem cells: transcript isoform expression, promoter methylation, and protein accumulation. *Biochimie*, 2013. 95: 1888-96.

152. Orloff JJ, Reddy D, de Papp AE, Yang KH, Soifer NE, y Stewart AF, Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev*, 1994. 15: 40-60.
153. Datta NS, Samra TA, Mahalingam CD, Datta T, y Abou-Samra AB, Role of PTH1R internalization in osteoblasts and bone mass using a phosphorylation-deficient knock-in mouse model. *J Endocrinol*, 2010. 207: 355-65.
154. Dean T, Vilardaga JP, Potts JT, Jr., y Gardella TJ, Altered selectivity of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) for distinct conformations of the PTH/PTHrP receptor. *Mol Endocrinol*, 2008. 22: 156-66.
155. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, Gardella TJ, y Vilardaga JP, Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol*, 2009. 5: 734-42.
156. Vilardaga JP, Gardella TJ, Wehbi VL, y Feinstein TN, Non-canonical signaling of the PTH receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 2012. 33: 423-31.
157. Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura JA, Wheeler DS, Ferrandon S, Gardella TJ, y Vilardaga JP, Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol*, 2011. 7: 278-84.
158. Jans DA, Thomas RJ, y Gillespie MT, Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a nucleocytoplasmic shuttling protein with distinct paracrine and intracrine roles. *Vitam Horm*, 2003. 66: 345-84.
159. Fiaschi-Taesch NM y Stewart AF, Minireview: parathyroid hormone-related protein as an intracrine factor--trafficking mechanisms and functional consequences. *Endocrinology*, 2003. 144: 407-11.
160. Fenton AJ, Kemp BE, Kent GN, Moseley JM, Zheng MH, Rowe DJ, Britto JM, Martin TJ, y Nicholson GC, A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology*, 1991. 129: 1762-8.

161. Hildreth BE, 3rd, Werbeck JL, Thudi NK, Deng X, Rosol TJ, y Toribio RE, PTHrP 1-141 and 1-86 increase in vitro bone formation. *J Surg Res*, 2010. 162: e9-17.
162. Lozano D, Fernández-de-Castro L, Portal-Núñez S, López-Herradón A, Dapía S, Gómez-Barrena E, y Esbrit P, The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia. *Br J Pharmacol*, 2011. 162: 1424-38.
163. Cornish J, Callon KE, Lin C, Xiao C, Moseley JM, y Reid IR, Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res*, 1999. 14: 915-22.
164. de Gortázar AR, Alonso V, Álvarez-Arroyo MV, y Esbrit P, Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int*, 2006. 79: 360-9.
165. Alonso V, de Gortazar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo MV, y Esbrit P, Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol*, 2008. 217: 717-27.
166. Garcia-Martin A, Acitores A, Maycas M, Villanueva-Penacarrillo ML, y Esbrit P, Src kinases mediate VEGFR2 transactivation by the osteostatin domain of PTHrP to modulate osteoblastic function. *J Cell Biochem*, 2013. 114: 1404-13.
167. Valin A, Guillen C, y Esbrit P, C-terminal parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (107-139) stimulates intracellular Ca(2+) through a receptor different from the type 1 PTH/PTHrP receptor in osteoblastic osteosarcoma UMR 106 cells. *Endocrinology*, 2001. 142: 2752-9.
168. Datta NS, Pettway GJ, Chen C, Koh AJ, y McCauley LK, Cyclin D1 as a target for the proliferative effects of PTH and PTHrP in early osteoblastic cells. *J Bone Miner Res*, 2007. 22: 951-64.

169. Martin TJ, Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone formation. *J Clin Invest*, 2005. 115: 2322-4.
170. Lozano D, de Castro LF, Dapía S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Álvarez-Arroyo MV, Gómez-Barrena E, y Esbrit P, Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology*, 2009. 150: 2027-35.
171. Tian Y, Xu Y, Fu Q, y He M, Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation in a Wnt/beta-catenin-dependent manner. *Mol Cell Biochem*, 2011. 355: 211-6.
172. Carpio L, Gladu J, Goltzman D, y Rabbani SA, Induction of osteoblast differentiation indexes by PTHrP in MG-63 cells involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. 281: E489-99.
173. de Castro LF, Lozano D, Dapía S, Portal-Núñez S, Caeiro JR, Gómez-Barrena E, y Esbrit P, Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid-hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16: 1157-68.
174. Miao D, Li J, Xue Y, Su H, Karaplis AC, y Goltzman D, Parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice. *Endocrinology*, 2004. 145: 3554-62.
175. Toribio RE, Brown HA, Novince CM, Marlow B, Hernon K, Lanigan LG, Hildreth BE, 3rd, Werbeck JL, Shu ST, Lorch G, Carlton M, Foley J, Boyaka P, McCauley LK, y Rosol TJ, The midregion, nuclear localization sequence, and C terminus of PTHrP regulate skeletal development, hematopoiesis, and survival in mice. *Faseb J*, 2010. 24: 1947-57.
176. Portal-Núñez S, Lozano D, de Castro LF, de Gortázar AR, Nogués X, y Esbrit P, Alterations of the Wnt/beta-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS Lett*, 2010. 584: 3095-100.

177. Weinstein RS, Jilka RL, Almeida M, Roberson PK, y Manolagas SC, Intermittent parathyroid hormone administration counteracts the adverse effects of glucocorticoids on osteoblast and osteocyte viability, bone formation, and strength in mice. *Endocrinology*, 2010. 151: 2641-9.
178. Chen HL, Demiralp B, Schneider A, Koh AJ, Silve C, Wang CY, y McCauley LK, Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein exert both pro- and anti-apoptotic effects in mesenchymal cells. *J Biol Chem*, 2002. 277: 19374-81.
179. Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, Fu Q, Gubrij I, Roberson PK, Weinstein RS, O'Brien CA, Manolagas SC, y Jilka RL, Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem*, 2003. 278: 50259-72.
180. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L, Babij P, Brown EL, Hill AA, Akhter MP, Johnson ML, Recker RR, Komm BS, y Bex FJ, Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem*, 2006. 281: 31720-8.
181. Nuche-Berenguer B, Portal-Nunez S, Moreno P, Gonzalez N, Acitores A, Lopez-Herradon A, Esbrit P, Valverde I, y Villanueva-Penacarrillo ML, Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor. *J Cell Physiol*, 2010.
182. Pacheco M, Valencia M, Caparrós-Martín JA, Mulero F, Goodship JA, y Ruíz-Pérez VL, Evc works in chondrocytes and osteoblasts to regulate multiple aspects of growth plate development in the appendicular skeleton and cranial base. *Bone*, 2012. 50: 28-41.

183. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2010. L276/33-L276/79.
184. Russell W y Burch R. The principles of humane experimental technique. 1959: London: Methuen and Co.ltd.
185. Cediél R, Riquelme R, Contreras J, Díaz A, y Varela-Nieto I, Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *Eur J Neurosci*, 2006. 23: 587-90.
186. Riquelme R, Cediél R, Contreras J, la Rosa L, y Murillo-Cuesta S, A comparative study of age-related hearing loss in wild type and insulin growth factor I deficient mice. *Front. Neuroanat.*, 2010. 4: 27.
187. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, y van Oers MH, Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994. 84: 1415-20.
188. Eruslanov E y Kusmartsev S, Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*, 2010. 594: 57-72.
189. Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227: 680-5.
190. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, y Colombo R, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 2003. 329: 23-38.
191. Livak KJ y Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25: 402-8.
192. Von Kossa J, *Beitr. Path. Anat*, 1901. 29: 62.
193. Serrano S, Aubia J, y Mariñoso M. Patología ósea metabólica. 1990, Barcelona.: Sandoz S.A.E.
194. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, y Parfitt AM, Standardized nomenclature,

symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 2012. 28: 2-17.

195. Ma T, Zhu J, Chen X, Zha D, Singhal PC, y Ding G, High glucose induces autophagy in podocytes. *Exp Cell Res*, 2013. 319: 779-89.
196. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, y Elazar Z, Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *Embo J*, 2007. 26: 1749-60.
197. Feng Z, Deng H, Du J, Chen D, Jiang R, y Liang X, Lentiviral-mediated RNAi targeting p38MAPK ameliorates high glucose-induced apoptosis in osteoblast MC3T3-E1 cell line. *Indian J Exp Biol*, 2011. 49: 94-104.
198. Zayzafoon M, Botolin S, y McCabe LR, P38 and activating transcription factor-2 involvement in osteoblast osmotic response to elevated extracellular glucose. *J Biol Chem*, 2002. 277: 37212-8.
199. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, y Genever PG, Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci*, 2006. 119: 1283-96.
200. Kolligs FT, Hu G, Dang CV, y Fearon ER, Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. *Mol Cell Biol*, 1999. 19: 5696-706.
201. Dostmann WR, (RP)-cAMPS inhibits the cAMP-dependent protein kinase by blocking the cAMP-induced conformational transition. *FEBS Lett*, 1995. 375: 231-4.
202. Bruns RF, Miller FD, Merriman RL, Howbert JJ, Heath WF, Kobayashi E, Takahashi I, Tamaoki T, y Nakano H, Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 176: 288-93.
203. Settembre C, Annunziata I, Spampinato C, Zarcone D, Cobellis G, Nusco E, Zito E, Tacchetti C, Cosma MP, y Ballabio A, Systemic inflammation and

- neurodegeneration in a mouse model of multiple sulfatase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104: 4506-11.
204. Zahm AM, Bohensky J, Adams CS, Shapiro IM, y Srinivas V, Bone cell autophagy is regulated by environmental factors. *Cells Tissues Organs*, 2011. 194: 274-8.
 205. Weinstein RS, Wan C, Liu Q, Wang Y, Almeida M, O'Brien CA, Thostenson J, Roberson PK, Boskey AL, Clemens TL, y Manolagas SC, Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. *Aging Cell*, 2010. 9: 147-61.
 206. Kenyon CJ, The genetics of ageing. *Nature*, 2010. 464: 504-12.
 207. Zhang L, Guo YF, Liu YZ, Liu YJ, Xiong DH, Liu XG, Wang L, Yang TL, Lei SF, Guo Y, Yan H, Pei YF, Zhang F, Papasian CJ, Recker RR, y Deng HW, Pathway-based genome-wide association analysis identified the importance of regulation-of-autophagy pathway for ultradistal radius BMD. *J Bone Miner Res*, 2010. 25: 1572-80.
 208. Brownlee M, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001. 414: 813-20.
 209. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, y Fukagawa M, Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Bone*, 2007. 40: 1408-14.
 210. Houstis N, Rosen ED, y Lander ES, Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 2006. 440: 944-8.
 211. Khosla S, Bellido TM, Drezner MK, Gordon CM, Harris TB, Kiel DP, Kream BE, LeBoff MS, Lian JB, Peterson CA, Rosen CJ, Williams JP, Winer KK, y Sherman SS, Forum on aging and skeletal health: summary of the proceedings of an ASBMR workshop. *J Bone Miner Res*, 2011. 26: 2565-78.
 212. Hamada Y, Fujii H, Kitazawa R, Yodoi J, Kitazawa S, y Fukagawa M, Thioredoxin-1 overexpression in transgenic mice attenuates streptozotocin-

induced diabetic osteopenia: a novel role of oxidative stress and therapeutic implications. *Bone*, 2009. 44: 936-41.

213. Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, y McCabe LR, Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology*, 2005. 146: 3622-31.
214. Balint E, Szabo P, Marshall CF, y Sprague SM, Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone*, 2001. 28: 21-8.
215. Botolin S y McCabe LR, Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J Cell Biochem*, 2006. 99: 411-24.
216. Wang W, Zhang X, Zheng J, y Yang J, High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biochem*, 2010. 338: 115-22.
217. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, y Demer LL, Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med*, 2001. 31: 509-19.
218. Motyl KJ, McCauley LK, y McCabe LR, Amelioration of type I diabetes-induced osteoporosis by parathyroid hormone is associated with improved osteoblast survival. *J Cell Physiol*, 2012. 227: 1326-34.
219. Wang W, Zhang X, Zheng J, y Yang J, High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biochem*, 2008. 338: 115-22.
220. Duque G, Li W, Vidal C, Bermeo S, Rivas D, y Henderson J, Pharmacological inhibition of PPARgamma increases osteoblastogenesis and bone mass in male C57BL/6 mice. *J Bone Miner Res*, 2013. 28: 639-48.

221. Han D, Yang B, Olson LK, Greenstein A, Baek SH, Claycombe KJ, Goudreau JL, Yu SW, y Kim EK, Activation of autophagy through modulation of 5'-AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from high glucose. *Biochem J*, 2010. 425: 541-51.
222. Avivar-Valderas A, Salas E, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Nagi C, Debnath J, y Aguirre-Ghiso JA, PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment. *Mol Cell Biol*, 2011. 31: 3616-29.
223. Lai EH, Hong CY, Kok SH, Hou KL, Chao LH, Lin LD, Chen MH, Wu PH, y Lin SK, Simvastatin alleviates the progression of periapical lesions by modulating autophagy and apoptosis in osteoblasts. *J Endod*, 2012. 38: 757-63.
224. Pantovic A, Krstic A, Janjetovic K, Kocic J, Harhaji-Trajkovic L, Bugarski D, y Trajkovic V, Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*, 2013. 52: 524-31.
225. Yu T, Robotham JL, y Yoon Y, Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103: 2653-8.
226. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, y Matsuhisa M, Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem*, 2005. 280: 847-51.
227. Kroemer G, Marino G, y Levine B, Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 2010. 40: 280-93.
228. She C, Zhu LQ, Zhen YF, Wang XD, y Dong QR, Activation of AMPK protects against hydrogen peroxide-induced osteoblast apoptosis through autophagy induction and NADPH maintenance: New implications for osteonecrosis treatment? *Cell Signal*, 2013. 26: 1-8.

229. Ueno T, Yamada M, Igarashi Y, y Ogawa T, N-acetyl cysteine protects osteoblastic function from oxidative stress. *J Biomed Mater Res A*, 2011. 99: 523-31.
230. Chan E, Chan J, y Schluger E, What is the Role of Nitric Oxide in Murine and Human Host Defense against Tuberculosis? *American Journal of respiratory cell and molecular biology.*, 2001. 25: 606-612.
231. Hie M, Iitsuka N, Otsuka T, y Tsukamoto I, Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of Sost and Dkk1 and inhibition of Akt activation. *Int J Mol Med*, 2011. 28: 455-62.
232. Takada S, Stark KL, Shea MJ, Vassileva G, McMahon JA, y McMahon AP, Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev*, 1994. 8: 174-89.
233. Bain G, Muller T, Wang X, y Papkoff J, Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 301: 84-91.
234. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, Pischon N, Trackman PC, Gerstenfeld L, y Graves DT, Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone*, 2007. 40: 345-53.
235. Cervenka I, Wolf J, Masek J, Krejci P, Wilcox WR, Kozubik A, Schulte G, Gutkind JS, y Bryja V, Mitogen-activated protein kinases promote WNT/beta-catenin signaling via phosphorylation of LRP6. *Mol Cell Biol*, 2011. 31: 179-89.
236. Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, y Rincon M, Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science*, 2008. 320: 667-70.

237. Flick L y Florczyk S, Exploring the cross-talk between p38 MAPK and canonical Wnt signaling pathways. *The Journal of Immunology*, 2007. 178: 94.15.
238. Zhang C, Cho K, Huang Y, Lyons JP, Zhou X, Sinha K, McCrea PD, y de Crombrughe B, Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105: 6936-41.
239. Cohen P y Frame S, The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2: 769-76.
240. Zhu G, Chai J, Ma L, Duan H, y Zhang H, Downregulated microRNA-32 expression induced by high glucose inhibits cell cycle progression via PTEN upregulation and Akt inactivation in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 433: 526-31.
241. Rane MJ, Song Y, Jin S, Barati MT, Wu R, Kausar H, Tan Y, Wang Y, Zhou G, Klein JB, Li X, y Cai L, Interplay between Akt and p38 MAPK pathways in the regulation of renal tubular cell apoptosis associated with diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. 298: F49-61.
242. Brasnyo P, Molnar GA, Mohas M, Marko L, Laczy B, Cseh J, Mikolas E, Szijarto IA, Merei A, Halmai R, Meszaros LG, Sumegi B, y Wittmann I, Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr*, 2011. 106: 383-9.
243. Kim SY, Lee JY, Park YD, Kang KL, Lee JC, y Heo JS, Hesperetin alleviates the inhibitory effects of high glucose on the osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells. *PLoS One*, 2013. 8: e67504.
244. Zhang Y y Yang JH, Activation of the PI3K/Akt pathway by oxidative stress mediates high glucose-induced increase of adipogenic differentiation in primary rat osteoblasts. *J Cell Biochem*, 2013. 114: 2595-602.
245. Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, y Klein PS, Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem*, 2003. 278: 33067-77.

246. Phiel CJ y Klein PS, Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. 41: 789-813.
247. Lin CL, Wang JY, Huang YT, Kuo YH, Surendran K, y Wang FS, Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17: 2812-20.
248. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, y Grodsky GM, Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*, 2003. 52: 1-8.
249. Ponugoti B, Dong G, y Graves DT, Role of forkhead transcription factors in diabetes-induced oxidative stress. *Exp Diabetes Res*, 2012. 2012: 939751.
250. Hamada Y, Fujii H, y Fukagawa M, Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone*, 2009. 45 Suppl 1: S35-8.
251. Wang X, Chen WR, y Xing D, A pathway from JNK through decreased ERK and Akt activities for FOXO3a nuclear translocation in response to UV irradiation. *J Cell Physiol*, 2012. 227: 1168-78.
252. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB, DiBacco S, de la Iglesia N, Gygi S, Blackwell TK, y Bonni A, A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell*, 2006. 125: 987-1001.
253. Ho KK, McGuire VA, Koo CY, Muir KW, de Olano N, Maifoshie E, Kelly DJ, McGovern UB, Monteiro LJ, Gomes AR, Nebreda AR, Campbell DG, Arthur JS, y Lam EW, Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 promotes its nuclear localization in response to doxorubicin. *J Biol Chem*, 2012. 287: 1545-55.
254. Almeida M, Unraveling the role of FoxOs in bone--insights from mouse models. *Bone*, 2011. 49: 319-27.
255. de Castro LF, Lozano D, Portal-Nunez S, Maycas M, De la Fuente M, Caeiro JR, y Esbrit P, Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of

- PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol*, 2012. 227: 1752-60.
256. Kulkarni NH, Halladay DL, Miles RR, Gilbert LM, Frolik CA, Galvin RJ, Martin TJ, Gillespie MT, y Onyia JE, Effects of parathyroid hormone on Wnt signaling pathway in bone. *J Cell Biochem*, 2005. 95: 1178-90.
 257. Guo J, Liu M, Yang D, Bouxsein ML, Saito H, Galvin RJ, Kuhstoss SA, Thomas CC, Schipani E, Baron R, Bringham FR, y Kronenberg HM, Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation. *Cell Metab*, 2010. 11: 161-71.
 258. Romero G, Sneddon WB, Yang Y, Wheeler D, Blair HC, y Friedman PA, Parathyroid hormone receptor directly interacts with dishevelled to regulate beta-Catenin signaling and osteoclastogenesis. *J Biol Chem*, 2010. 285: 14756-63.
 259. Wan M, Yang C, Li J, Wu X, Yuan H, Ma H, He X, Nie S, Chang C, y Cao X, Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev*, 2008. 22: 2968-79.
 260. Esbrit P, Álvarez-Arroyo MV, De Miguel F, Martín O, Martínez ME, y Caramelo C, C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *J Am Soc Nephrol*, 2000. 11: 1085-92.
 261. Szkudelski T y Szkudelska K, Streptozotocin induces lipolysis in rat adipocytes in vitro. *Physiol Res*, 2002. 51: 255-9.
 262. Kelleher AR, Fairchild TJ, y Keslacy S, STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF-kappaB canonical cascade activation. *Acta Diabetol*, 2010. 47: 315-23.
 263. Suzuki K, Miyakoshi N, Tsuchida T, Kasukawa Y, Sato K, y Itoi E, Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone(1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone*, 2003. 33: 108-14.

264. Illien-Junger S, Grosjean F, Laudier DM, Vlassara H, Striker GE, y Iatridis JC, Combined anti-inflammatory and anti-age drug treatments have a protective effect on intervertebral discs in mice with diabetes. *PLoS One*, 2013. 8: e64302.
265. Armas LA, Akhter MP, Drincic A, y Recker RR, Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus. *Bone*, 2013. 50: 91-6.
266. Gaudio A, Privitera F, Battaglia K, Torrisi V, Sidoti MH, Pulvirenti I, Canzonieri E, Tringali G, y Fiore CE, Sclerostin levels associated with inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. 97: 3744-50.
267. Nishikawa T y Araki E, Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal*, 2007. 9: 343-53.
268. Wong CM, Marcocci L, Liu L, y Suzuki YJ, Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal*, 2010. 12: 393-404.
269. Jilka RL, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Roberson PK, Weinstein RS, y Manolagas SC, Decreased oxidative stress and greater bone anabolism in the aged, when compared to the young, murine skeleton with parathyroid hormone administration. *Aging Cell*, 2010. 9: 851-67.
270. Yamaguchi M, Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation: Involvement in Osteoporosis with Obesity and Diabetes. *Journal Bone Marrow Res*, 2013. 1: 4.
271. Li W, Hu W, y Ho F, High glucose induced bone loss via attenuating the proliferation and osteoblastogenesis and enhancing adipogenesis of bone marrow mesenchymalstem cells. *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.*, 2013. 25: 1-15.
272. Graves D, Alblowi J, Paglia D, O'Connor J, y Lin S, Impact of diabetes on fracture healing. *J Exp Clin Med*, 2011. 3: 3-8.

273. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, y Manolagas SC, Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem*, 2007. 282: 27298-305.
274. Li L, Xia Y, Wang Z, Cao X, Da Z, Guo G, Qian J, Liu X, Fan Y, Sun L, Sang A, y Gu Z, Suppression of the PI3K-Akt pathway is involved in the decreased adhesion and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from non-obese diabetic mice. *Cell Biol Int*, 2011. 35: 961-6.
275. Hughes JW y Herold KC, Novel SIRT1 mutation linked to autoimmune diabetes in humans. *Cell Metab*, 2013. 17: 311-2.
276. Simic P, Zainabadi K, Bell E, Sykes DB, Saez B, Lotinun S, Baron R, Scadden D, Schipani E, y Guarente L, SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating beta-catenin. *EMBO Mol Med*, 2013. 5: 430-40.
277. Murillo-Cuesta S, Rodriguez-de la Rosa L, Cediell R, Lassaletta L, y Varela-Nieto I, The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci*, 2011. 4: 11.
278. Yakar S, Courtland HW, y Clemmons D, IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *J Bone Miner Res*, 2010. 25: 2543-52.
279. Cao JJ, Kurimoto P, Boudignon B, Rosen C, Lima F, y Halloran BP, Aging impairs IGF-I receptor activation and induces skeletal resistance to IGF-I. *J Bone Miner Res*, 2007. 22: 1271-9.
280. Courtland HW, Kennedy OD, Wu Y, Gao Y, Sun H, Schaffler MB, y Yakar S, Low levels of plasma IGF-1 inhibit intracortical bone remodeling during aging. *Age (Dordr)*, 2012. 35: 1691-703.
281. Bikle D, Majumdar S, Laib A, Powell-Braxton L, Rosen C, Beamer W, Nauman E, Leary C, y Halloran B, The skeletal structure of insulin-like growth factor I-deficient mice. *J Bone Miner Res*, 2001. 16: 2320-9.

282. Sakata T, Wang Y, Halloran BP, Elalieh HZ, Cao J, y Bikle DD, Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor-I (IGF-I) by inhibiting activation of the IGF-I signaling pathways. *J Bone Miner Res*, 2004. 19: 436-46.
283. Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, Beamer W, Majumdar S, y Halloran BP, Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res*, 2002. 17: 1570-8.
284. Wang Y, Nishida S, Elalieh HZ, Long RK, Halloran BP, y Bikle DD, Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*, 2006. 21: 1350-8.
285. Hayden JM, Mohan S, y Baylink DJ, The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone*, 1995. 17: 93S-98S.
286. Compston JE, Skeletal actions of intermittent parathyroid hormone: effects on bone remodelling and structure. *Bone*, 2007. 40: 1447-52.
287. Iida-Klein A, Zhou H, Lu SS, Levine LR, Ducayen-Knowles M, Dempster DW, Nieves J, y Lindsay R, Anabolic action of parathyroid hormone is skeletal site specific at the tissue and cellular levels in mice. *J Bone Miner Res*, 2002. 17: 808-16.
288. Horwitz MJ, Augustine M, Kahn L, Martin E, Oakley CC, Carneiro RM, Tedesco MB, Laslavic A, Sereika SM, Bisello A, Garcia-Ocana A, Gundberg CM, Cauley JA, y Stewart AF, A comparison of parathyroid hormone-related protein (1-36) and parathyroid hormone (1-34) on markers of bone turnover and bone density in postmenopausal women: the PrOP study. *J Bone Miner Res*, 2013. 28: 2266-76.
289. Hanyu R, Wehbi VL, Hayata T, Moriya S, Feinstein TN, Ezura Y, Nagao M, Saita Y, Hemmi H, Notomi T, Nakamoto T, Schipani E, Takeda S, Kaneko K, Kurosawa H, Karsenty G, Kronenberg HM, Vilardaga JP, y Noda M, Anabolic action of parathyroid hormone regulated by the beta2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 109: 7433-8.

290. Xu J, Rong H, Ji H, Wang D, Wang J, Zhang W, y Zhang Y, Effects of different dosages of parathyroid hormone-related protein 1-34 on the bone metabolism of the ovariectomized rat model of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 2013. 93: 276-87.
291. Kim SW, Pajevic PD, Selig M, Barry KJ, Yang JY, Shin CS, Baek WY, Kim JE, y Kronenberg HM, Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 2012. 27: 2075-84.
292. Rihani-Basharat S y Lewinson D, PTHrP(107-111) inhibits in vivo resorption that was stimulated by PTHrP(1-34) when applied intermittently to neonatal mice. *Calcif Tissue Int*, 1997. 61: 426-8.
293. Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, Burghardt A, Elalieh HZ, Hamilton MM, Majumdar S, Halloran BP, Clemens TL, y Bikle DD, IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res*, 2007. 22: 1329-37.
294. Yakar S, Bouxsein ML, Canalis E, Sun H, Glatt V, Gundberg C, Cohen P, Hwang D, Boisclair Y, Leroith D, y Rosen CJ, The ternary IGF complex influences postnatal bone acquisition and the skeletal response to intermittent parathyroid hormone. *J Endocrinol*, 2006. 189: 289-99.
295. Lau KH, Baylink DJ, Zhou XD, Rodriguez D, Bonewald LF, Li Z, Ruffoni D, Muller R, Kesavan C, y Sheng MH, Osteocyte-derived insulin-like growth factor I is essential for determining bone mechanosensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013. 305: E271-81.
296. He J, Rosen CJ, Adams DJ, y Kream BE, Postnatal growth and bone mass in mice with IGF-I haploinsufficiency. *Bone*, 2006. 38: 826-35.
297. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efstratiadis A, y Clemens TL, Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem*, 2002. 277: 44005-12.

298. Miao D, Tong XK, Chan GK, Panda D, McPherson PS, y Goltzman D, Parathyroid hormone-related peptide stimulates osteogenic cell proliferation through protein kinase C activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem*, 2001. 276: 32204-13.
299. Bikle DD y Wang Y, Insulin like growth factor-I: a critical mediator of the skeletal response to parathyroid hormone. *Curr Mol Pharmacol*, 2012. 5: 135-42.
300. Kawashima Y, Takahashi S, y Kanzaki S, Familial short stature with IGF-I receptor gene anomaly. *Endocr J*, 2012. 59: 179-85.
301. Okano T, Xuan S, y Kelley MW, Insulin-like growth factor signaling regulates the timing of sensory cell differentiation in the mouse cochlea. *J Neurosci*, 2011. 31: 18104-18.
302. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, Johnson RS, y Kahn CR, Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 1994. 372: 186-90.
303. DeMambro VE, Kawai M, Clemens TL, Fulzele K, Maynard JA, Marin de Evsikova C, Johnson KR, Canalis E, Beamer WG, Rosen CJ, y Donahue LR, A novel spontaneous mutation of *Irs1* in mice results in hyperinsulinemia, reduced growth, low bone mass and impaired adipogenesis. *J Endocrinol*, 2010. 204: 241-53.
304. Simonska-Cichocka E, Gumprecht J, Zychma M, Witkowska A, Misiolek H, Slawska H, Oslislo A, y Grzeszczak W, The polymorphism in insulin receptor substrate-1 gene and birth weight in neonates at term. *Endokrynol Pol*, 2008. 59: 212-6.
305. Song G, Ouyang G, y Bao S, The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 2005. 9: 59-71.
306. Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, y Cheng SL, Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2001. 276: 14443-50.

307. Rodríguez-de la Rosa L, Fernández-Sánchez L, Germain F, Murillo-Cuesta S, Varela-Nieto I, de la Villa P, y Cuenca N, Age-related functional and structural retinal modifications in the Igf1-/- null mouse. *Neurobiol Dis*, 2012. 46: 476-85.
308. Sánchez-Calderón H, Rodríguez-de la Rosa L, Milo M, Pichel JG, Holley M, y Varela-Nieto I, RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS One*, 2010. 5: e8699.
309. Varela-Nieto I, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-de la Rosa L, Lassatetta L, y Contreras J, IGF-I deficiency and hearing loss: molecular clues and clinical implications. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2013. 10: 460-72.
310. Pfeilschifter J, Laukhuf F, Muller-Beckmann B, Blum WF, Pfister T, y Ziegler R, Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J Clin Invest*, 1995. 96: 767-74.
311. Watson P, Lazowski D, Han V, Fraher L, Steer B, y Hodsman A, Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone*, 1995. 16: 357-65.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. Publicaciones

* Igual contribución.

Lozano D, Sánchez-Salcedo S, Portal-Núñez S, Vila M, **López-Herradón A**, Ardura JA, Mulero F, Gómez-Barrena E, Vallet-Regí M y Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-111) improves the bone regeneration potential of gelatin-glutaraldehyde biopolymer-coated hydroxyapatite. Acta Biomater. 2013. (Enviado y en revisión).

López-Herradón A^{*}, Rodríguez-de la Rosa L^{*}, Portal-Núñez S, Murillo-Cuesta S, Lozano D, Cediell R, Varela-Nieto y Esbrit P. Treatment with N- and C-Terminal Peptides of Parathyroid Hormone-Related Protein Partly Compensate the Skeletal Abnormalities in IGF-I Deficient Mice. PLoS One, 2013 (Aceptado). Factor de impacto: 4,09

García-Martín A^{*}, Ardura JA^{*}, Maycas M, Lozano D, **López-Herradón A**, Portal-Núñez S, García-Ocaña A y Esbrit P. Role of nuclear localization signal of parathyroid hormone-related protein in osteoblastic cells. Mol. Endocrinol. 2013 (En 2ª revisión actualmente). Factor de impacto: 4,74

Bartolomé A, **López-Herradón A**, Portal-Núñez S, García-Aguilar A, Esbrit P, Benito M y Guillén C. Autophagy impairment aggravates the inhibitory effects of high glucose on osteoblast viability and function. Biochem J. 2013, 455 (3): 329-37. Factor de impacto: 4,65. **Artículo seleccionado de alto interés por el equipo editorial.**

López-Herradón A, Portal-Núñez S, García-Martín A, Lozano D, Pérez-Martínez FC, Ceña V y Esbrit P. Inhibition of the canonical Wnt pathway by high glucose can be reversed by parathyroid hormone-related protein in osteoblastic cells. J. Cell Biochem. 2013, 114(8):1908-16. Factor de impacto: 3,06.

Lozano D, Fernández-de-Castro L, Portal-Núñez S, **López-Herradón A**, Dapía S, Gómez-Barrena E, Esbrit P. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia. Br J Pharmacol. 2011;162(6):1424-38. Factor de impacto: 5,06

Nuche-Berenguer B, Portal-Núñez S, Moreno P, González N, Acitores A, **López-Herradón A**, Esbrit P, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor. J Cell Physiol. 2010; 225(2):585-92. Factor de impacto: 4,21.

8.2. Comunicaciones a Congresos

2014. Herbert Fleisch Workshop (Brujas, Bélgica). Portal-Núñez S, Ardura J.A., Del Valle O, Lozano D, Gutiérrez-Rojas I, **López-Herradón A**, De La Fuente M, Esbrit P. DIABETIC STATUS WORSENS BONE DETERIORATION IN AGING MICE

2013. CORS, 8th Meeting of the Combined Orthopaedic Research Societies (Venecia, Italia). Comunicación Oral: Daniel Lozano, **Ana López-Herradón**, Sergio Portal-Núñez, Juan Antonio Ardura-Rodriguez, Mercedes Vila, Sandra Sánchez-Salcedo, Francisca Mulero, Enrique Gómez-Barrena, María Vallet-Regí y Pedro Esbrit. PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN (107-111) IMPROVES THE BONE REGENERATION POTENTIAL OF biopolymer-coated nanocrystalline hydroxyapatite (HAGlu).

2012. XVII Congreso Sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral SEIOMM (Cuenca, España). Póster: **Ana López-Herradón**, Lourdes Rodríguez-de la Rosa, Sergio Portal-Núñez, Silvia Murillo-Cuesta, Daniel Lozano, Adela García-Martín, Isabel Varela-Nieto y Pedro Esbrit. LA PROTEÍNA RELACIONADA CON LA PARATHORMONA EJERCE ACCIONES OSTEOGÉNICAS EN AUSENCIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA-I

2012. 6th International Congress of the GRS and IGF society (München, Alemania). Póster: L. Rodríguez-de la Rosa, **A. López-Herradón**, Silvia Murillo-Cuesta, S. Portal-Núñez, D. Lozano, P. Esbrit, I. Varela-Nieto. INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I-DEFICIENCY CAUSES SKELETAL DEFECTS THAT CAN BE PARTIALLY COMPENSATED BY PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN IN MICE

2012. ECTS 39th Annual Congress (Stockholm, Suecia). Póster: Adela García, Marta Maycas, Daniel Lozano, **Ana López-Herradón**, Sergio Portal-Núñez, Adolfo García-Ocaña, Pedro Esbrit. FUNCTIONAL ROLE OF THE OSTEOSTATIN AND NUCLEAR LOCALIZATION SIGNAL SEQUENCES OF PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN (PTHrP) IN OSTEOBLASTIC CELLS.

2012. ECTS 2012 39th Annual Congress (Stockholm, Suecia). Comunicación oral: **Ana López-Herradón**, Lourdes Rodríguez-de la Rosa, Sergio Portal-Núñez, Silvia Murillo-Cuesta, Daniel Lozano, Adela García-Martín, Isabel Varela-Nieto, Pedro Esbrit. PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN (PTHrP) (1-36) AND PTHrP (109-111) DISPLAY DIFFERENT OSTEOGENIC ACTIONS IN INSULIN GROWTH FACTOR I NULL MICE.

2011. XVI Congreso Sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral SEIOMM (A Coruña, España). Comunicación oral: **López-Herradón A.**, Lozano D., Portal-Núñez S., Esbrit Argüelles P. INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA RELACIONADA CON LA PARATHORMONA PTHrP CON LA VÍA WNT CANÓNICA EN EL ESTADO DIABÉTICO.

2010. 37th European Symposium on Calcified Tissues (Glasgow, Escocia). Comunicación oral: **A. López-Herradón**, D. Lozano, S. Portal-Núñez, L. F. de Castro, P. Esbrit. BOTH N- AND C-TERMINAL FRAGMENTS OF PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN COUNTERACTS THE INHIBITION OF THE WNT/ β -CATENIN PATHWAY IN MICE WITH DIABETES-RELATED OSTEOPENIA.

8.3. Premios y becas

2012. *European Calcified Tissue Society* (ECTS) *TRAVEL AWARD*. Premio a la comunicación presentada al 39º Congreso de la ECTS, titulada: "PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN (PTHrP) (1-36) AND PTHrP (109-111) DISPLAY DIFFERENT OSTEOGENIC ACTIONS IN INSULIN GROWTH FACTOR I NULL MICE" (**Ana López-Herradón**, Lourdes Rodríguez-de la Rosa, Sergio Portal-Núñez, Silvia Murillo-Cuesta, Daniel Lozano, Adela García-Martín, Isabel Varela-Nieto, Pedro Esbrit), Mayo de 2012.

2011. Beca concedida por la Universidad Internacional Menéndez Pelayo (UIMP) para la asistencia al curso de verano "*Regenerative medicine: from basic research to orthopaedic applications and beyond*" en Santander (España) y presentación del trabajo: Both N- and C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein can reverse the deleterious effects of oxidative stress in mouse mesenchymal cells *in vitro*. Lozano D, Portal-Núñez S, **López-Herradón A**, Gómez-Barrena E, Esbrit P.

2010. *European Calcified Tissue Society (ECTS) NEW INVESTIGATOR AWARD*. Premio a la comunicación presentada al 37º Congreso de la ECTS, titulada "BOTH N- AND C-TERMINAL FRAGMENTS OF PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN COUNTERACTS THE INHIBITION OF THE Wnt/B-CATENIN PATHWAY IN MICE WITH DIABETES-RELATED OSTEOPENIA" (**A. López-Herradón**, D. Lozano, S. Portal-Núñez, L. F. de Castro, P. Esbrit), Junio de 2010.

